

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Identifizierung von Stoffwechselwegen
in humanen Ovarialkarzinomzellen
mit potentiell therapeutischer Relevanz**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Julia Obert
aus Lich

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 03.03.2017

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Rolf Müller

1. Korreferent: Dr. Silke Reinartz

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	V
2 Summary.....	VII
3 Abkürzungsverzeichnis.....	IX
4 Einleitung	1
4.1 Der Warburg-Effekt.....	2
4.2 Wodurch entsteht der Warburg Effekt?	4
4.3 Molekulare Mechanismen eines veränderten Stoffwechsels in Tumorzellen	6
4.3.1 Veränderung der Expression von Genen im Glukosemetabolismus	6
4.3.2 Veränderte Gene im Citratzyklus.....	8
4.3.3 Veränderte Gene in der Atmungskette	9
4.3.4 Veränderte Gene im Lipidstoffwechsel	10
4.3.5 Einfluss des Tumormilieus	12
4.4 Pharmakologische Möglichkeiten zur Modulation des Stoffwechsels	13
4.4.1 Modulation des Tumorstoffwechsels durch den Einsatz von Dichloracetat	14
4.4.2 Modulation des Tumorstoffwechsels durch den Einsatz von Oxamat	15
4.4.3 Modulation des Tumorstoffwechsels durch den Einsatz von Etomoxir	15
4.4.4 Modulation des Tumorstoffwechsels durch den Einsatz von SB204990.....	16
4.4.5 Transportsysteme für cytoplasmatisches NADH	17
4.5 Ziel dieser Arbeit.....	18
5 Materialien und Methoden	19
5.1 Materialien	19
5.1.1 Geräte	19
5.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
5.1.3 Chemikalien	20
5.1.4 Puffer und Lösungen.....	22
5.1.4.1 Allgemeine Puffer und Lösungen.....	22
5.1.4.2 Puffer und Lösungen für Seahorse-Messungen.....	22
5.1.4.3 Lösungen zur Herstellung von Proteinextrakten	23
5.1.4.4 Lösungen für Enzymaktivitätsassays.....	23
5.1.4.5 Lösungen für den MTT-Test.....	24
5.1.4.6 Medien für Zellkultur	24
5.1.5 Verwendete Zellen.....	24
5.1.6 Verwendete vorgefertigte Systeme (Kits)	26
5.1.7 qPCR-Primer für Expressionsanalysen	26
5.1.8 Sterilisation von Lösungen und Gebrauchsgütern	28

5.1.9	Computerprogramme und Datenbanken	28
5.2	Methoden	29
5.2.1	Zellbiologische Methoden	29
5.2.1.1	Zellkultur der etablierten Zelllinien	29
5.2.1.1.1	Auftauen von etablierten Zelllinien	29
5.2.1.1.2	Passagieren von etablierten Zelllinien.....	29
5.2.1.1.3	Nicht-adhärenente Kultivierung von etablierten Zelllinien	30
5.2.1.1.4	Kryokonservierung von etablierten Zelllinien.....	30
5.2.1.1.5	Zählen von Zellen.....	30
5.2.1.2	Zellkultur der OC-Zellen aus Aszites	30
5.2.1.2.1	Zusammensetzung des OCMI-Mediums.....	31
5.2.1.2.2	Auftauen der primären Tumorzellen.....	31
5.2.1.2.3	Durchführung der OCMI-Kultur	32
5.2.1.2.4	Zellzahlbestimmung.....	32
5.2.1.2.5	Kryokonservieren von OCMI-Kulturen.....	32
5.2.1.3	Mykoplasmentest	32
5.2.2	Molekularbiologische und Biochemische Methoden	33
5.2.2.1	Expressionsanalysen	33
5.2.2.1.1	Isolierung von RNA aus Zellkulturen.....	33
5.2.2.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
5.2.2.1.3	cDNA-Synthese	34
5.2.2.1.4	Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR).....	35
5.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten	36
5.2.3	Metabolische Analysen.....	36
5.2.3.1	Metabolische Analysen mittels Seahorse XFe Analysers.....	36
5.2.3.1.1	Das Messprinzip des Seahorse XFe96 Flux Analyzers.....	36
5.2.3.1.2	Simultane Messungen von H ⁺ und O ₂	39
5.2.3.1.3	Etablierung von Seahorse-Messungen einer neuen Zelllinie	40
5.2.3.1.4	Bestimmung der mitochondrialen Respiration von Zellen	42
5.2.3.1.5	Bestimmung der glykolytischen Funktion von Zellen	43
5.2.3.2	Enzymaktivitätsmessungen	45
5.2.3.2.1	Zelllyse für Enzymaktivitätsmessungen	45
5.2.3.2.2	Auswertung der Enzymaktivitätsmessung.....	46
5.2.3.2.3	Messung der Aconitase-Aktivität.....	46
5.2.3.2.4	Messung der Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase (NAD ⁺ bzw. NADP ⁺ abhängig)	47
5.2.3.2.5	Messung der Citrat-Synthase Aktivität	48

5.2.3.2.6	Laktat-Dehydrogenase-Enzymaktivitäts-Assay	49
5.2.3.2.7	Messung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität	50
5.2.3.2.8	Messung der Cytochrom-c-Oxidase Aktivität	51
5.2.3.3	Detektion von phosphorylierter Pyruvat-Dehydrogenase und deren Gesamtmenge	51
5.2.3.4	Echtzeit-Zellanalyse mit dem xCELLigence RTCA (real time cell analyzer)	54
5.2.3.4.1	Komponenten des Systems	54
5.2.3.4.2	Messprinzip des xCELLigence RTCA	54
5.2.3.4.3	Optimierung der Zellzahl für xCELLigence RTCA-Messungen	55
5.2.3.4.4	Proliferationsmessungen mit dem xCELLigence-System	56
5.2.3.5	Metabolische ¹³ C-Stoffflussanalyse	57
5.2.3.6	Colorimetrische Bestimmung von Glykogen	59
5.2.3.7	MTT-Test	60
5.2.4	Statistische Auswertung	61
6	Ergebnisse	62
6.1	Vergleichende Expressionsuntersuchung wichtiger am Metabolismus beteiligter Schlüsselenzyme in OC-Zellen, etablierten Tumorzelllinien und der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A	62
6.1.1	Glykolyse-assoziierte Gene	63
6.1.2	Fettsäuremetabolismus-assoziierte Gene	65
6.1.3	Citratzyklus-assoziierte Gene	67
6.1.4	Atmungskette-assoziierte Gene	69
6.2	Metabolische Charakterisierung von OC-Zellen, etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A	71
6.2.1	Vergleichende Untersuchung der präferentiellen Substratnutzung	72
6.2.2	Vergleichende Untersuchung der mitochondrialen Respiration und der glykolytischen Funktion	76
6.2.3	Vergleichende Untersuchung der Nutzung verschiedener Stoffwechselwege unter Inhibitor-Einwirkung	79
6.2.3.1	Inhibition der PDKs durch DCA und dessen Einfluss auf Metabolismus und Proliferation	80
6.2.3.2	Einfluss des LDH-Inhibitors Oxamat auf Metabolismus und Proliferation	87
6.2.3.3	Hemmung des mitochondrialen Fettsäuretransports mittels Etomoxir und dessen Einfluss auf Metabolismus und Proliferation	92
6.2.3.4	Hemmung der Fettsäure-Synthese durch Inhibition der ACLY mit Hilfe von SB204990 und dessen Einfluss Metabolismus und Proliferation	96
6.2.3.5	Einfluss der Malat-Aspartat-Shuttle Blockade durch Inhibition der AST mit Hilfe von AOA auf Metabolismus und Proliferation	101
6.2.4	Synergistische Effekte der Kombination von metabolischen Inhibitoren auf Proliferation von OC-Zellen, etablierten Tumorzelllinien und der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A	106

6.3 Besonderheiten im Metabolismus der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3.....	114
7 Diskussion	130
7.1 Vergleichende Expressionsuntersuchung wichtiger am Metabolismus beteiligter Schlüsselenzyme in OC-Zellen, etablierten Tumorzelllinien und der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A.....	130
7.2 Metabolische Charakterisierung von OC-Zellen, etablierten Tumorzelllinien und der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A.....	133
7.3 Synergistische Effekte der Kombination von metabolischen Inhibitoren auf Proliferation der OC-Zellen.....	147
7.4 Besonderheiten im Metabolismus der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3.....	152
7.5 Schlussfolgerungen und Perspektiven	159
8 Literaturverzeichnis	161
Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	178
Danksagung.....	179

1 Zusammenfassung

Ein typisches Merkmal von Tumorzellen ist ihr veränderter Intermediärstoffwechsel. Tumorzellen sind häufig gekennzeichnet durch eine gesteigerte Glukoseaufnahme sowie die Bildung von Laktat auch in Anwesenheit von Sauerstoff (aerobe Glykolyse, "Warburg-Effekt"). Als weitere verstärkt ablaufende Stoffwechselwege rücken zunehmend der Abbau von Glutamin als anaplerotische Reaktion des Citratzyklus ("Glutaminolyse"), die *de novo* Fettsäuresynthese und der Fettsäureabbau über die β -Oxidation in den Mittelpunkt der Forschung. Die Inhibition dieser Stoffwechselwege könnte eine geeignete Angriffsstelle für künftige Krebstherapien sein.

Das Ovarialkarzinom ist die gynäkologische Krebserkrankung mit der höchsten Letalität und weist häufig die Bildung von Aszites als besonderes Charakteristikum auf. Die Isolierung primärer Tumorzellen aus Aszites bietet eine einzigartige Möglichkeit zur Erforschung metabolischer Aberrationen in dieser Tumorentität. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung tumorspezifischer Stoffwechselwege als mögliche Angriffspunkte neuer Therapieansätze. Hierzu wurden patientenabgeleitete Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu einer Reihe etablierter Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A eingesetzt. Voraussetzung dafür war die genaue Charakterisierung des metabolischen Phänotyps mit Hilfe von Expressionsanalysen und "metabolic profiling" mittels des Seahorse XFe Analyzers. Dafür wurden die metabolischen Parameter OCR (oxygen consumption rate) und ECAR (extracellular acidification rate) sowie die entsprechenden Kapazitäten unter Normalbedingungen und unter Anwendung von metabolischem Druck, vor allem durch den Einsatz von metabolischen Inhibitoren, gemessen.

Im Zuge dieser Arbeit fiel eine Besonderheit im Stoffwechsel der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 auf. Die ATP-Produktion aus Glukose mittels oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS) ist in diesen Zellen blockiert. Vermutet wurde zunächst ein Defekt im Citratzyklus. Dies ist jedoch nicht kompatibel mit dem Befund, dass SKOV-3 Zellen die ATP-Gewinnung mittels OXPHOS über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten können. Deshalb wurde ein "fatty acid cycle" (FAC) als alternativer Stoffwechselweg postuliert, der aus dem zyklischen Auf- und Abbau von Fettsäuren besteht. Die Vorteile des FAC für die Tumorzelle könnten in einer Unabhängigkeit von externer Substratzufuhr bei einer gleichzeitig gesteigerten anabolen Kapazität aufgrund der Verlagerung des Glukosestoffwechsels in Richtung Pentosephosphatweg sein. Aufgrund der potentiellen Vorteile des FAC für proliferierende Zellen ist es wahrscheinlich, dass dieser Zyklus auch in anderen Zellen operativ ist. Die Ursache für die Besonderheiten des SKOV-3 Stoffwechsels ist möglicherweise ein verminderter Transport von Pyruvat in die

Mitochondrienmatrix aufgrund einer verringerten Expression des Gens für den Mitochondrial Pyruvate Carrier 1 (*MPC1*).

Ein weiterer wichtiger Befund war die Feststellung einer gesteigerten aeroben Glykolyse und β -Oxidation in allen patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen. Durch den Einsatz von Inhibitoren für Tumorzellen relevante Stoffwechselwege wurde die Möglichkeit einer Interferenz mit der Proliferation bzw. dem Überleben dieser Zellen mit Hilfe des xCELLigence RTCA untersucht. Dabei zeigte sich, dass einzelne Inhibitoren nur in exzessiv hohen Konzentrationen die Proliferation (wahrscheinlich unspezifisch) hemmten, dass aber die Kombination verschiedener Stoffwechselmodulatoren in Konzentrationen, in denen sie als einzelner Wirkstoff wirkungslos waren, zu deutlichen synergistischen Effekten führte. Vor allem die Kombination von Oxamat (Laktat-Dehydrogenase-Inhibitor) mit den Inhibitoren DCA (Inhibitor der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen; PDKs), AOA (Inhibitor der Aspartat-Transaminase und damit des Malat-Aspartat-Shuttles) sowie SB204990 (Inhibitor der ATP-Citrat-Lyase) verursachte eine deutliche Proliferationsinhibition, bis hin zum Absterben der Zellen. Dennoch unterscheiden sich Ovarialkarzinomzellen von verschiedenen Patientinnen zum Teil deutlich hinsichtlich ihres Metabolismus bzw. der Auswirkungen von Inhibitoren auf die Proliferation. Beispiele hierfür sind Unterschiede bei (i) der Nutzung von Glutamin und Pyruvat als alleinigem Substrat, (ii) der Abhängigkeit von PDKs, Laktat-Dehydrogenase und Aspartat-Transaminase (iii) der Korrelation metabolischer Reaktionen auf Inhibitoren mit Effekten auf die Proliferation. Dies zeigt, dass eine potentielle Anwendung metabolischer Inhibitoren eine personalisierte Tumordiagnostik notwendig macht, um individuell optimale Kombinationen von Wirkstoffen zu identifizieren. Zudem könnte die Untersuchung dieser Hemmstoffe in Kombination mit Chemotherapeutika oder Modulatoren von Signalwegen ggf. zu optimierten Therapiekonzepten führen.

2 Summary

A characteristic feature of tumor cells is their altered intermediary metabolism. Tumor cells frequently exhibit increased glucose uptake and lactate production even in the presence of oxygen (aerobic glycolysis, "Warburg effect"). Other metabolic pathways activated in tumor cells, including the degradation of glutamin as an anaplerotic reaction of the citric acid cycle ("glutamaminolysis"), *de novo* fatty acid synthesis and fatty acid degradation via β -oxidation also have attracted particular attention. These altered metabolic pathways represent promising potential pharmacologic targets for cancer therapy .

Ovarian cancer is the most lethal of all gynaecologic malignancies with the development of ascites in the peritoneal cavity as a characteristic feature. The isolation of primary cancer cells from ascites provides a unique opportunity to investigate metabolic aberrations in this tumor entity. The aim of this study was the identification of tumor-specific metabolic pathways as potential targets for new therapeutic approaches. For this purpose, patient-derived ovarian carcinoma cells were analyzed in comparison to a number of established tumor cell lines and the non-transformed breast epithelial cell line MCF-10A. A prerequisite for this study was the characterization of the metabolic phenotypes by expression analysis and "metabolic profiling" using the Seahorse XFe analyzer. Towards this goal, the metabolic parameters OCR (oxygen consumption rate) and ECAR (extracellular acidification rate) as well as the corresponding metabolic capacities were measured under normal conditions and metabolic pressure, mainly induced by metabolic inhibitors.

This work revealed a specific metabolic feature of the ovarian carcinoma cell line SKOV-3. ATP production from glucose by oxidative phosphorylation (OXPHOS) is blocked in these cells. Initially, this was hypothesized to be caused by a defect in TCA-cycle. However, this hypothesis is not compatible with the finding that SKOV-3 cells are able to sustain ATP recovery via OXPHOS over long periods of time. Therefore, a "fatty acid cycle" (FAC) was postulated as an alternative metabolic pathway. This pathway consists of the cyclic synthesis and degradation of fatty acids. The advantages of the FAC could be independence of external supply of substrates and increased anabolic capacity due to a shift of glucose metabolism towards pentose phosphate pathway.

Due to the advantages of the FAC for proliferating cells, it is likely that this cycle is also operative in a variety of other cells. The reason for the abnormal SKOV-3 metabolism was in the end localised as a defect in pyruvate transport into the mitochondrial matrix, which is due to a reduced expression of Mitochondrial Pyruvate Carrier 1 gene (*MPC1*).

Another important result was the finding of increased aerobic glycolysis and β -oxidation in all patient-derived ovarian carcinoma cells. By using inhibitors of tumor relevant metabolic pathways, the potential to interfere with the proliferation or survival of these cells was examined using the xCELLigence RTCA. It was shown that single inhibitors were able to reduce proliferation (probably unspecifically) only at excessive concentrations, but that the combination of different metabolic modulators at concentrations ineffective on their own resulted in significant synergistic effects. Especially the combination of Oxamate (lactate dehydrogenase inhibitor) with the inhibitors DCA (inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinases; PDKs), AOA (inhibitor of aspartate transaminase and thus of the malate aspartate shuttle) and SB204990 (inhibitor of ATP citrate lyase) caused a distinct proliferation inhibition, including cell death. Nevertheless ovarian carcinoma cells from different patients differ in part substantially with respect to their metabolism and the anti-proliferative effects of inhibitors. Examples are differences in (i) the utilization of glutamine and pyruvate as the sole substrate, (ii) the dependence of PDKs, lactate dehydrogenase and aspartate transaminase, and (iii) the correlation of metabolic responses to inhibitors with anti-proliferative effects. This demonstrates that the potential application of metabolic inhibitors necessitates personalized tumor diagnostics to identify individually optimal combinations of drugs. Furthermore, the investigation of these inhibitors in combination with chemotherapeutic agents or modulators of signaling pathways could possibly lead to optimized therapeutic concepts.

3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
2-DG	2-Deoxyglukose
Abb.	Abbildung
ACAA2	3-Ketoacyl-CoA Thiolase
ACACA	Acetyl-CoA Carboxylase α
ACLY	ATP-Citrat-Lyase
ACO	Aconitase
ACO2	Aconitase 2
AKT/PKB	„RAC-alpha-serine/threonine-protein-kinase“/„proteinkinaseB“
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AOA	(O-(Carboxymethyl)hydroxylamine hemihydrochloride) / Aminooxyacetat
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
ATP5H	ATP-Synthase
bp	Basenpaare
BSA	„Bovine serum albumin“
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
cDNA	„complementary DNA“
CI	Zellindex
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPT1A	Carnitin- Palmitoyltransferase 1A
CS	Citrat Synthase
Ct	<i>cycle threshold</i>
Cyt-c	Cytochrom-c
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
DBQ	Decylubiquinone
DCA	Dichloracetat
DDM	Dodecylmaltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Desoxyribonucleic Acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
ECAR	„extracellular acidification rate“
et al.	Et alii („und andere“)
ETC	„electron transport chain“ (Elektronentransportkette)
ETFA	Elektron Transfer Flavoprotein A
ETFB	Elektron Transfer Flavoprotein B
eV	Elektronenvolt
FAC	„fatty acid cycle“
FASN	Fettsäure Synthase
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone

FCS	„fetal calf serum“ (Fetales Kälberserum)
FH	Fumarat Hydratase
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GLUT1	Glukosetransporter Typ 1
GLUT3	Glukosetransporter Typ 3
h	Stunden
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HK2	Hexokinase 2
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IDH2	Isocitrat Dehydrogenase 2
IDH3a	Isocitrat Dehydrogenase 3a
LDH	L-Lactatdehydrogenase
LDHA	Laktat Dehydrogenase A
LDHB	Laktat Dehydrogenase B
LED	„light-emmiting diode“ (Leuchtdiode)
LKB1	„liver kinase B1“
m	milli
M	Molar
MCT1	Monocarboxylat Transporter 1
MCT4	Monocarboxylat Transporter 4
MDH2	Malat Dehydrogenase 2
ME3	Malatenzym 3
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MLYCD	Malonyl-CoA Carboxylase
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mpH	Milli pH
mRNA	messenger RNA
mTOR	"mammalian target of rapamycin"
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid
mU	Milli Units (Enzymeinheit)
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OCMI	„Ovarian Carcinoma Modified Ince medium“

OCR	„oxygen consumption rate“
OD	optische Dichte
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
PDC	„pyruvate dehydrogenase complex“
PDC	Pyruvat-Dehydrogenase Komplex
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PDHA1	Pyruvat-Dehydrogenase α 1
PDK	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase
PDK1	Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 1
PDK2	Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 2
PDK3	Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 3
PDK4	Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 4
PDP	Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase
PE	Phycerythrin
pH	Wasserstoffexponent (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PKM2	Pyruvat Kinase M2
Poly-HEMA	Poly (2-hydroxyethyl methacrylate)
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RNA	„ribonuclein acid“ (Ribonukleinsäure)
RPL27	60S ribosomales Protein L27
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTCA	„real time cell analyzer“
SCO2	Cytochrome-c Oxidase Assembly Protein
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDHB	Succinat-Dehydrogenase B
SDHC	Succinat-Dehydrogenase C
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
Sek	Sekunde
Ser	Serin
SLC25A20	Carnitin-Acylcarnitin Translocase
SUCLG1	Succinyl-CoA Ligase
t	Zeit
TCA-Zyklus	„tricarboxylic acid cycle“
TIGAR	"TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator"
U	„unit“ (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UQCRH	Ubiquinol Cytochrom C Reduktase
UV	Ultraviolett
Z	Impedanz
z.B.	zum Beispiel

ZTI	Zentrum für Tumor und Immunbiologie
α	Anti
Δ	Delta, Differenz
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

4 Einleitung

Tumore werden nach ihrem Verlauf in benigne (gutartige) oder maligne (bösartige) Neoplasien unterteilt. Benigne Tumore sind generell langsam wachsende, sich ausdehnende Gewebe, die das umgebende Gewebe komprimieren, aber keine Metastasen bilden. Maligne Tumore sind üblicherweise schnell wachsend, dringen in umliegende Gewebe ein und können Metastasen bilden. Metastasen (Sekundäre Tumore) bestehen aus Zellen, die sich vom Primärtumor abgelöst haben und von diesem unabhängig sind (Alison 2001).

Krebs ist, nach Herz-Kreislauferkrankungen, die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2015). Das Ovarialkarzinom ist laut einer Studie von 2010 die neunthäufigste Krebsart und die fünfthäufigste tödlich verlaufende Krebserkrankung bei Frauen (Colombo *et al.* 2010). Das HGSC (hochgradig seröses ovariales Adenokarzinom) ist dabei der häufigste Subtyp. Die große Gefahr liegt darin, dass es meist erst spät entdeckt wird, da es lange Zeit symptomlos verläuft und erst im fortgeschrittenen Stadium zu diagnostizieren ist (Ledermann *et al.* 2013). Aufgrund dessen ist es auch die gynäkologische Krebserkrankung mit der höchsten Letalität (Kurman & Shih 2010), und einer 5-Jahres Überlebensrate von weniger als 40 % (Ledermann *et al.* 2013). Besondere Charakteristika des HGSC sind das Ablösen von Tumorzellen in einem frühen Stadium, ihre Verbreitung über die Peritonealflüssigkeit zu anderen Organen im Bauch- und Beckenbereich, wo sie Metastasen bilden und die Entstehung von Aszites in der Bauchhöhle (Lengyel 2010). Aszites ist eine pathologische Flüssigkeitsansammlung in der Peritonealhöhle, die jedoch eine einzigartige Möglichkeit zur Erforschung des HGSC darstellt, da es möglich ist, aus dieser Flüssigkeit primäre Tumorzellen zu gewinnen, diese zu kultivieren und zu untersuchen.

Hanahan und Weinberg vermuteten sechs essentielle Veränderungen in der Zellphysiologie, die ein malignes Wachstum hervorrufen: Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, verringerte Sensitivität gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen, Umgehung der Apoptose, unbegrenztes Replikationspotential, nicht nachlassende Angiogenese und Gewebeinvasion (Hanahan and Weinberg, 2000). Zusätzlich zu diesen bekannten Eigenschaften von Tumorzellen rückt in den letzten Jahren auch immer mehr der deregulierte Tumorstoffwechsel in den Fokus der Krebsforschung (Moreno-Sánchez *et al.* 2007; Hanahan & Weinberg 2011; Hirschhaeuser *et al.* 2011). Die am besten charakterisierte Veränderung im Tumormetabolismus ist der so genannte Warburg-Effekt (Cairns *et al.* 2011).

4.1 Der Warburg-Effekt

Der Begründer des Tumormetabolismus ist der deutsche Arzt und Biochemiker Otto Heinrich Warburg. Dieser fand vor mehr als 90 Jahren heraus, dass Tumorzellen Glukose auf andere Weise metabolisieren als normale Zellen (Warburg *et al.* 1924). In Anwesenheit von Sauerstoff verstoffwechseln die meisten differenzierten Zellen Glukose in der Glykolyse zu Pyruvat, welches anschließend während der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) in den Mitochondrien zu CO_2 oxidiert wird. Hierbei ist Sauerstoff als finaler Elektronenakzeptor essenziell. Ist Sauerstoff limitierend, sind die Zellen gezwungen das benötigte ATP mittels anaerober Glykolyse zu gewinnen. Hierzu wandeln sie das während der Glykolyse entstandene Pyruvat in Laktat um (anaerobe Glykolyse). Dieser Schritt ist notwendig, da hierbei NADH zu NAD^+ reoxidiert wird und damit wieder als Elektronenakzeptor zur Fortführung der Glykolyse zur Verfügung steht.

Warburg beobachtete, dass Tumorzellen den Großteil des Pyruvats in Laktat umwandeln, obwohl ausreichend Sauerstoff vorhanden ist. Dieses Phänomen wird deshalb als aerobe Glykolyse oder Warburg-Effekt bezeichnet (Abbildung 4.1.). Seither konnte eine gesteigerte aerobe Glykolyse, die sich auch durch eine gesteigerte Glukoseaufnahme auszeichnet, in vielen Tumorzelllinien beschrieben werden (Gatenby & Gillies 2004; Moreno-Sánchez *et al.* 2007; Marín-Hernández *et al.* 2011).

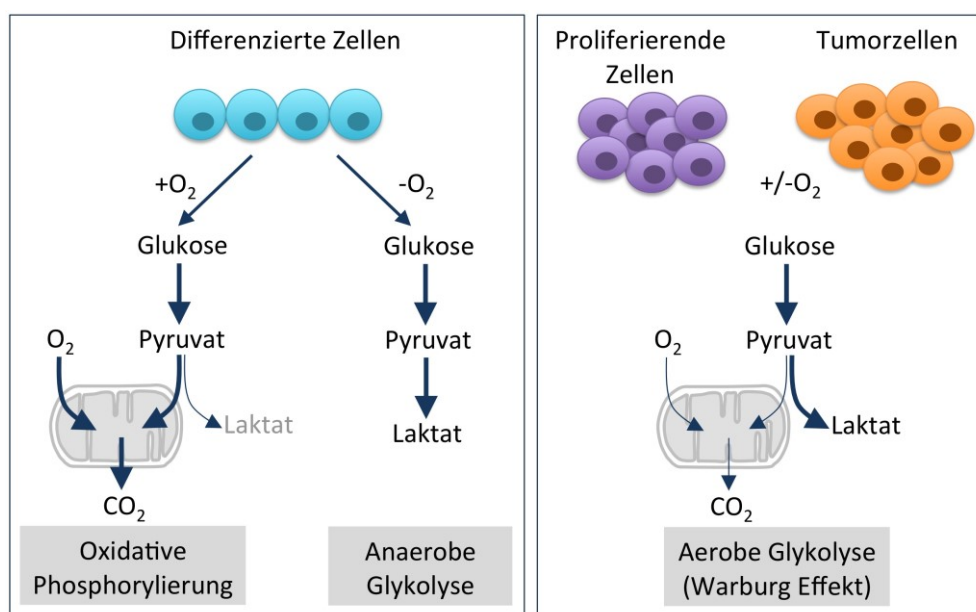


Abbildung 4.1. Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen oxidativer Phosphorylierung, anaerober Glykolyse und Aerober Glykolyse, auch Warburg Effekt genannt.

Details finden sich im Text. (Modifiziert nach Vander Heiden *et al.* 2009)

Die Abhängigkeit der Tumorzellen von einer gesteigerten Glukose-Aufnahme, wie Warburg sie beschrieben hat, wird sich in der Medizin zunutze gemacht. Mit Hilfe der ^{18}F -Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomografie (FDG-PET), welche ein radioaktiv markiertes Glukose-Analogon verwendet, um Regionen mit einer verstärkten Glukoseaufnahme zu detektieren, konnte bereits in tausenden von Krebspatienten primäre Tumore und Metastasen identifiziert werden (Czernin & Phelps 2002).

Für das Auftreten des Warburg-Effektes wurden diverse Ursachen diskutiert. Warburg selbst ging von einem irreversiblen mitochondrialen Defekt aus, der die Respiration stört und zur Abhängigkeit der Zellen von der aeroben Glykolyse führt. (Warburg 1956; Vander Heiden *et al.* 2009). Weiterführende Studien konnten irreversible mitochondriale Defekte jedoch weder bestätigen noch widerlegen. Unter anderem wurde gezeigt, dass die Inhibition der Glykolyse zu einer gesteigerten OXPHOS führt, was gegen einen mitochondrialen Defekt sprechen würde (Weinhouse 1976; Bui & Thompson 2006; Fantin *et al.* 2006; Moreno-Sánchez *et al.* 2007). Dieses Ergebnis wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass der Warburg-Effekt auch in nicht-transformierten proliferierenden Zellen stattfindet (López-Lázaro 2008; Vander Heiden *et al.* 2009). Andererseits konnten Mutationen in der mitochondrialen DNA gefunden werden, die zu einer Fehlfunktion der Mitochondrien führen können (Carew & Huang 2002; Singh 2004; Taylor & Turnbull 2005).

Offenbar ist eine Fehlfunktion der Mitochondrien zumindest keine allgemeingültige Erklärung für den Warburg-Effekt.

Bei der Metabolisierung von Glukose zu Laktat entstehen 2 ATP, während die vollständige Oxidierung eines Glukose-Moleküls 32 ATP liefern würde. Das wirft die Frage auf, warum bezogen auf die ATP-Produktion ein weniger effizienter Stoffwechselweg einen effizienteren Weg ersetzt.

Tatsächlich sind die Gründe für den Warburg-Effekt bis heute nicht geklärt. Spekulationen reichen von einem Wachstumsvorteil im angesäuerten Milieu (Gatenby & Gillies 2004), über die Bereitstellung von Bausteinen zur Synthese neuer Moleküle (Vander Heiden *et al.* 2009), Anpassungsmechanismen an die im Tumor häufig herrschenden hypoxischen Bedingungen (Gatenby & Gillies 2004; Brahimi-Horn *et al.* 2007), Veränderungen in metabolischen Enzymen (Rempel *et al.* 1996; Neumann *et al.* 2004; Coy *et al.* 2005; Pawlu *et al.* 2005; Selak *et al.* 2005), bis zur Erklärung, dass die Produktion von ATP, trotz geringerer Ausbeute, über die aerobe Glykolyse effizienter als über OXPHOS ist (Pfeiffer *et al.* 2001; Bui & Thompson 2006).

4.2 Wodurch entsteht der Warburg Effekt?

Neben der Frage, warum Tumorzellen eine gesteigerte aerobe Glykolyse aufweisen, werden auch die Veränderungen, die den Warburg Effekt begünstigen diskutiert.

Sich teilende Zellen müssen drei Grundbedürfnisse erfüllen: eine schnelle ATP-Produktion, um das Energielevel konstant zu erhalten, eine gesteigerte Synthese von Makromolekülen und eine verstärkte Aufrechterhaltung des Redox-Status. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, sind Veränderungen im Stoffwechsel von Tumorzellen nötig.

Dieser veränderte Tumormetabolismus kann beispielsweise durch genetische Veränderungen der Tumorzellen, wie der Verlust von Tumorsuppressoren, die Aktivierung von Onkogenen oder Veränderungen von metabolischen Enzymen verursacht sein (Cairns *et al.* 2011) (Abbildung 4.2.).

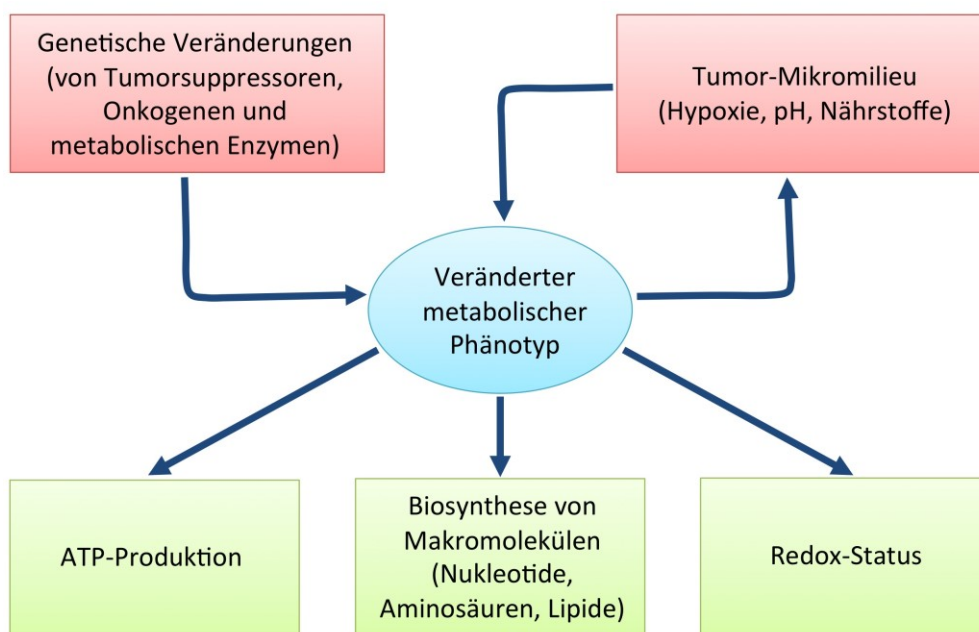


Abbildung 4.2. Veränderungen des metabolischen Phänotyps in Tumorzellen.

Der metabolische Phänotyp von Tumorzellen wird durch spezifische genetische Mutationen und die Reaktion auf das externe Tumor-Mikromilieu kontrolliert. Signalwege, welche Wachstum und Überleben kontrollieren, sind häufig durch einen Verlust von Tumorsuppressoren (wie z.B. p53) oder der Aktivierung von Onkogenen (wie z.B. PI3K) gekennzeichnet. Die dadurch veränderte Signalübertragung modifiziert den zellulären Metabolismus, um die Grundbedürfnisse der Zellteilung zu erfüllen. Abnormale Bedingungen des Mikromilieus wie Hypoxie, ein niedriger pH-Wert und/oder der Mangel an Nährstoffen, rufen Reaktionen der Tumorzelle hervor, die wiederum die metabolische Aktivität beeinflussen. Diese Anpassungen verbessern den Tumormetabolismus im Bezug auf Proliferation, da angemessene Energielevel in Form von ATP und Bausteine für die Synthese von Makromoleküle bereitgestellt werden können, sowie der Redox-Status von Zellen aufrecht erhalten werden kann. (Modifiziert nach Cairns *et al.*, 2011)

Der PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) -Signalweg ist einer der Signalwege, der in Tumoren am häufigsten verändert ist und wird durch Mutationen in

Tumorsuppressorgenen wie *PTEN* (Phosphatase und Tensin Homolog), Mutationen der PI3K selbst, oder abweichende Signalübertragung des Rezeptors aktiviert (Wong *et al.* 2010). Einer der *downstream* Effektoren der PI3K ist AKT1 („RAC-alpha-serine/threonine-protein-kinase“), welche den Tumormetabolismus über eine gesteigerte Expression an Glukose-Transportern oder die Phosphorylierung von glykolytischen Schlüsselenzymen beeinflusst (Abbildung 4.3.). AKT1 stimuliert auch die Signalübertragung der Kinase mTOR ("mammalian target of rapamycin"). Die AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) hat den gegenteiligen Effekt von AKT, wirkt als Inhibitor von mTOR und koppelt den Energie-Status einer Zelle an Wachstumssignale. Mutationen wie beispielsweise die des Tumorsuppressores LKB1 ("liver kinase B1") können die AMPK-Signalübertragung supprimieren, was zu einem Verlust der mTOR Inhibition führt, sodass sich Tumorzellen auch bei Nährstoffmangel teilen können (Shackelford & Shaw 2009; Cairns *et al.* 2011) (Abbildung 4.3.).

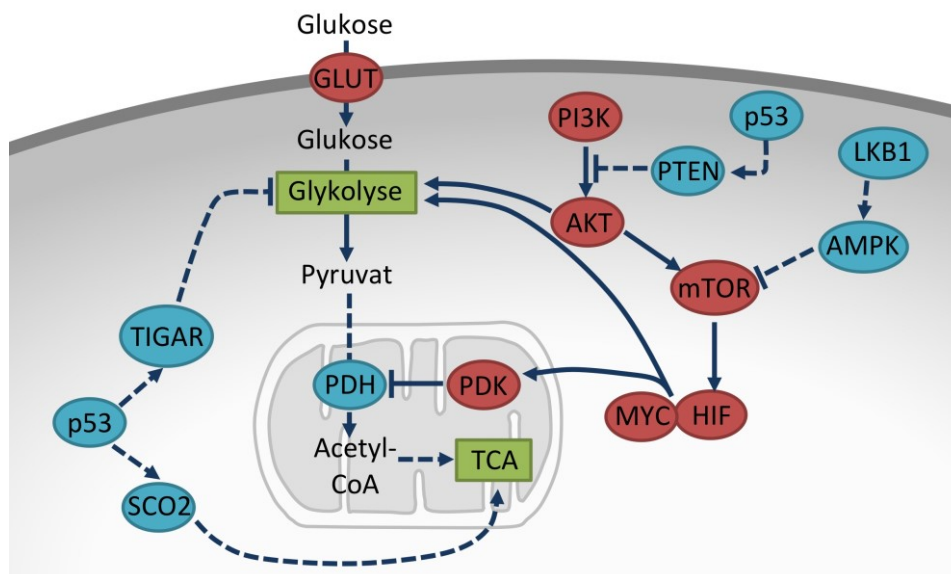


Abbildung 4.3. Molekulare Mechanismen, die den Warburg Effekt begünstigen.

Die detaillierte Erklärung ist im Text zu finden. Durchgezogene Linien kennzeichnen Stoffwechsel- oder Signalwege, die in Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen verstärkt ablaufen. Gestrichelte Linien sind Stoffwechsel- oder Signalwege, die in Tumorzellen abgeschwächt sind. Rote Faktoren begünstigen den glykolytischen Phänotyp und blaue die OXPHOS. (Modifiziert nach Cairns *et al.* 2011)

mTOR verändert den Stoffwechsel über unterschiedliche Wege. Aktiviertes mTOR stimuliert Protein- und Lipid-Biosynthese, Zellwachstum und ist häufig während der Tumorgenese konstitutiv aktiviert (Guertin & Sabatini 2007). Außerdem führt mTOR zu einer Aktivierung von HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor 1), der die Transkription von Genen induziert, die Glukose-Transporter und die meisten glykolytischen Enzyme kodieren (Semenza 2010). Dies begünstigt den glykolytischen Phänotypen, womit sowohl eine gesteigerte Glukoseaufnahme und

-verstoffwechslung als auch eine verstärkte Laktatbildung gemeint ist. Zusätzlich aktiviert es die PDKs (Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen), welche den PDC (Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex) (Vgl. 4.3.1.) inaktivieren (Kim *et al.* 2006; Papandreou *et al.* 2006; Lu *et al.* 2008) (Abbildung 4.3.). Auch der Transkriptionsfaktor MYC führt zu einer ähnlichen Veränderung des Metabolismus wie HIF, da stark exprimiertes MYC Glukose-Transporter und glykolytische Enzyme aktiviert (Kim *et al.* 2007; Dang *et al.* 2008) (Abbildung 4.3.).

Der Tumorsuppressor p53 wiederum inhibiert die Glykolyse durch TIGAR ("TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator") (Bensaad *et al.* 2006), aktiviert den mitochondrialen Metabolismus durch SCO2 (Matoba *et al.* 2006) oder indem es die Expression von *PTEN* unterstützt (Stambolic *et al.* 2001). Demnach führt eine Mutation von *TP53*, welche häufig in Tumoren vorkommt, ebenfalls zur Verstärkung des glykolytischen Phänotypen (Abbildung 4.3.).

Diese genetischen Veränderungen der Tumorzellen bewirken einen erhöhten glykolytischen Flux, der hauptsächlich durch eine Steigerung der Expression zahlreicher Glykolyse-assoziiierter Gene in den meisten humanen Krebsarten verursacht wird (Sattler *et al.* 2010). Im Folgenden werden Expressionsänderungen glykolytischer Enzyme beschrieben, die vermehrt im Zusammenhang mit Tumoren auftreten.

4.3 Molekulare Mechanismen eines veränderten Stoffwechsels in Tumorzellen

4.3.1 Veränderung der Expression von Genen im Glukosemetabolismus

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Umsetzung von Glukose ist deren Transport in die Zelle über Glukose-Transporter (GLUT). Tatsächlich ist eine gesteigerte Expression von *GLUT1* und *GLUT3* in vielen Krebsarten beobachtet worden und gilt als grundlegender Bestandteil des neoplastischen Prozesses (Younes *et al.* 1996; Macheda *et al.* 2005; Barron *et al.* 2012).

Des Weiteren gilt die Umsetzung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat durch das Enzym Hexokinase 2 (HK2) als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Glykolyse. Auch die Expression dieses Gens ist in vielen Tumoren gesteigert (Mathupala *et al.* 2001; Sun *et al.* 2011) und korreliert beispielsweise in Gehirnmetastasen von Brustkrebspatientinnen mit einer schlechten Prognose (Palmieri *et al.* 2009).

Ebenso ist die Expression der Laktat-Dehydrogenase (LDH) zur Aufrechterhaltung des glykolytischen Phänotyps von großer Bedeutung. Diese katalysiert die Konversion von Pyruvat zu Laktat, ein notwendiger Schritt für die Regeneration von NAD^+ und damit verbundene Fortführung der Glykolyse. Es wurde beobachtet, dass die Verminderung des LDH-Levels

Tumor-reprimierende Effekte in Krebszellen hat (Bui & Thompson 2006; Fantin *et al.* 2006). Für die Aufrechterhaltung der pH-Homöostase ist die Ausschleusung des gebildeten Laktats unerlässlich. Dies geschieht über die Monocarboxylat-Transporter (MCTs) (Halestrap & Price 1999). Eine gesteigerte Expression von *MCT4* korreliert mit einer schlechten Prognose bei Prostata-Karzinomen (Pértega-Gomes *et al.* 2011) während die Expression von *MCT1* mit einem aggressiveren Phänotyp von Brustkrebs assoziiert ist (Pinheiro *et al.* 2011). Außerdem wurde eine Überexpression beider Isoformen mit Kolon- und Cervixkarzinomen in Verbindung gebracht (Pinheiro *et al.* 2008a, b). Zusätzlich führt die MCT1-Suppression *in vitro* zu einer Proliferationsinhibition der Zellen (Mazan-Mamczarz *et al.* 2009).

Weiterhin ist ein wichtiger Regulator der Glykolyse die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH, wird auch als Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex = PDC bezeichnet), welche die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert und dadurch Pyruvat aus der Glykolyse dem Citratzyklus zuführt. Die Aktivität der PDH wird u.a. durch die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (PDK1, PDK2, PDK2, PDK4) reguliert, welche die PDH inhibitorisch phosphorylieren (Harris *et al.* 2001, 2002; Sugden & Holness 2003). Tatsächlich wird ein geringes PDH (Pyruvat-Dehydrogenase)-Level mit Haut- und Leberkrebs in Verbindung gebracht (Eboli 1985). Eine Überexpression verschiedener *PDK* Isoformen wurde ebenfalls in diversen Krebsarten beobachtet (Kim *et al.* 2006; Lu *et al.* 2008; McFate *et al.* 2008; Kirito *et al.* 2009; Kamarajugadda *et al.* 2012; Ho & Coomber 2014). Außerdem wird diskutiert, ob die Inhibition von PDK1 und möglicherweise auch anderen PDKs ein neues Target zur Krebsbehandlung darstellt, da deren Inhibition die OXPHOS steigern kann (Roche & Hiromasa 2007; Kamarajugadda *et al.* 2012) und somit dem glykolytischen Phänotyp entgegen wirkt.

Neben dem gesteigerten Bedarf an ATP ist es, wie bereits erwähnt, für die Zellen notwendig, neue Makromoleküle synthetisieren zu können und ihren Redox-Status aufrecht zu erhalten, wobei die Pyruvat-Kinase einen wichtigen Beitrag leistet.

Die Pyruvat-Kinase katalysiert die Umwandlung von Phosphoenol-Pyruvat zu Pyruvat und hat zwei Isoformen: PKM1 und PKM2. Während die *PKM1* in den meisten adulten Geweben exprimiert ist, kommt *PKM2* nur in embryonalen und proliferierenden Geweben vor. Bei transformierten Zellen wird die Expression von *PKM1* inhibiert und die von *PKM2* wiederhergestellt (Christofk *et al.* 2008).

PKM2 kommt in einer dimeren oder in einer tetrameren Form vor. Die tetramere Form besitzt eine hohe Affinität für ihr Substrat Phosphoenol-Pyruvat (PEP), während die dimere Form eine geringe Affinität für PEP aufweist. Demnach ist die dimere M2 Isoform eine inaktivere Form und wirkt sich eher inhibierend auf die Glykolyse aus. Anders als man vermuten würde, ist diese inaktivere Form maßgeblich in Tumoren vertreten (Eigenbrodt *et al.* 1992; Mazurek *et al.*

2001). Durch die inhibierende Wirkung der dimeren PKM2 wird die Glykolyse abgebremst, was zur verstärkten Nutzung von Glykolyse-Metaboliten im Pentosephosphatweg und anderen Stoffwechselwegen führt. Auf diese Weise können große Mengen an NADPH und anderen Makromolekülen produziert werden, welche dann für die Produktion von Nukleotiden, Aminosäuren und Lipiden zur Verfügung stehen (Vander Heiden *et al.* 2009; Cairns *et al.* 2011). NADPH fungiert als Kofaktor und steht als Reduktionsäquivalent in vielen enzymatischen Prozessen zur Synthese von Makromolekülen zur Verfügung, bewerkstelligt aber auch eine zweite wichtige Aufgabe in der Zelle. Es dient ebenso als Antioxidant in der Kontrolle des Redox-Status, indem es ROS (reaktive Sauerstoffspezies) mit Hilfe von Glutathion unschädlich machen und den Redox-Status aufrechterhalten kann, was eine Voraussetzung sich teilender Zellen darstellt (Abbildung 4.2.) (Cairns *et al.* 2011).

4.3.2 Veränderte Gene im Citratzyklus

Wie ursprünglich von Warburg postuliert, wirken sich neben der gesteigerten Expression Glykolyse-assoziiierter Gene, auch mitochondriale Defekte auf den Glukosemetabolismus im Tumor aus. Diese können entweder den Citratzyklus oder die Atmungskette betreffen. Im Folgenden werden zunächst Gene des Citratzyklus, welche im Zusammenhang mit Tumoren verstärkt exprimiert sind, beschrieben.

So wird beispielsweise der Verlust der Citrat-Synthase (CS), welche die Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat bewerkstelligt, direkt mit der Induktion des Warburg-Effekts und Tumormalignität in Verbindung gebracht (Lin *et al.* 2012).

Des Weiteren wurde die Expression des Gens *ACO* (Aconitase), welches die Interkonversion von Citrat zu Isocitrat katalysiert, mit der Entstehung von Tumoren assoziiert. Eine verminderte Aconitase-Expression geht beispielsweise mit einer schlechten Prognose von Magenkrebs Patienten einher (Wang *et al.* 2013).

Mutationen in den Genen *SDH* (Succinat-Dehydrogenase), *IDH* (Isocitrat-Dehydrogenase) und *FH* (Fumarat-Hydratase) gehören zu den am besten charakterisierten Enzymen mit Fehlfunktionen im Citratzyklus und zeigen ähnliche Konsequenzen, wie Veränderungen in der ETC (Elektronentransportkette) und OXPHOS (Cardaci & Ciriolo 2012).

Die Isocitrat-Dehydrogenase (*IDH*), welche die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat katalysiert, ist in 70 % aller Grad II-III Hirntumore (Parsons *et al.* 2008; Cohen *et al.* 2013), aber auch in akuter myeloischer Leukämie (Cardaci & Ciriolo 2012), in T-Zell Lymphomen (Cairns *et al.* 2012), Schilddrüsen-, Dickdarm- und Prostata Tumoren mutiert (Mi *et al.* 2009; Yen *et al.* 2010). Darunter sind hauptsächlich die NADP⁺-abhängigen Isoformen der

IDH betroffen (*IDH1* und *IDH2*). Der genaue Mechanismus, wie eine *IDH* Mutation zur Tumorpromotion beiträgt, ist nicht eindeutig geklärt. Eine wichtige Rolle könnte hierbei jedoch die NADPH-Produktion spielen, die für proliferierende Zellen sowohl für die Synthese von Makromolekülen als auch die Aufrechterhaltung des Redox-Status wichtig ist (Thompson 2009; Vander Heiden *et al.* 2009).

Mutationen in einer der vier Untereinheiten des SDH-Komplexes (Succinat Dehydrogenase), welcher auch als Tumorsuppressor gilt und die Oxidation von Succinat zu Fumarat katalysiert, wurden in Paragangliomen entdeckt (Baysal *et al.* 2000, 2002; Niemann & Müller 2000; Astuti *et al.* 2001).

FH (Fumarat Hydratase) ist ein homotetrameres TCA-Enzym, welches die reversible Hydratisierung von Fumarat zu Malat bewerkstelligt. Eine Mutation in diesem Enzym ist mit MCUL (Multiplen, kutanen und Uterus-Leiomyom) und HLRCC (hereditäre Leiomyomatose mit Nierenzellkarzinom) (Launonen *et al.* 2001; Tomlinson *et al.* 2002) sowie mit Brust-, Blasen und Leyding-Zell-Tumoren assoziiert (Carvajal-Carmona *et al.* 2006; Lehtonen *et al.* 2006). Sowohl für die SDH, als auch für die FH sind hauptsächlich Mutationen beschrieben, die zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität führen (Cardaci & Ciriolo 2012), was die Akkumulation von Succinat bzw. Fumarat nach sich zieht. Diese anfallenden Metabolite wiederum führen über die Inhibition der HIF- α Prolyl-Hydrolase zu einer Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 α (Selak *et al.* 2005; Thompson 2009). HIF wiederum bewirkt, wie bereits beschrieben (siehe 0.), eine Steigerung der glykolytischen Kapazität und eine Verminderung der OXPHOS.

4.3.3 Veränderte Gene in der Atmungskette

Auch Veränderungen von Genen im Rahmen der Atmungskette könnten an der gesteigerten aeroben Glykolyse beteiligt sein. Die Succinat-Dehydrogenase ist sowohl ein Teil des Citrat-Zyklus als auch der Atmungskette und wird mit vielen Krebsarten assoziiert (siehe 4.3.2). Das als Komplex III der Atmungskette bezeichnete Enzym UQCRH (Cytochrom-c-Oxireduktase) katalysiert in der Atmungskette den Elektronentransfer vom reduzierten Ubiquinon oder Coenzym-Q-10 zum Cytochrom-c, wobei Elektronen in den mitochondrialen Intermembranraum gepumpt werden. Mutationen, die *UQCRH* betreffen, wurden in vielen Krebsarten, wie zum Beispiel im Darm (Polyak *et al.* 1998), dem Ovar (Liu *et al.* 2001), der Schilddrüse (Máximo *et al.* 2002) und der Brust (Owens *et al.* 2011) gefunden.

Die ATP-Synthase ist das finale Enzym in der oxidativen Phosphorylierung und wird auch als Komplex V bezeichnet. Mutationen in diesem Enzym wurden bereits in Schilddrüsen- (Máximo

et al. 2002), Pankreas- (Jones *et al.* 2001) und Prostata-Krebs (Petros *et al.* 2005) nachgewiesen.

4.3.4 Veränderte Gene im Lipidstoffwechsel

Obwohl der Warburg-Effekt als bestdokumentierter metabolischer Phänotyp in Tumorzellen gilt, ist dieses Merkmal nicht für alle Krebsarten allgemein gültig (Moreno-Sánchez *et al.* 2007). Neben dem Glukosestoffwechsel spielt auch der Fettsäuremetabolismus eine große Rolle für Krebszellen. Die *de novo* Synthese von Fettsäuren wird für die Bildung von Plasmamembranen, also für die Proliferation von Zellen, benötigt (Carracedo *et al.* 2013). Ebenso ist der Abbau von Fettsäuren, die sogenannte β -Oxidation, von großer Bedeutung. Fettsäuren stellen eine nicht unerhebliche Energiequelle für die Zellen dar. Relativ zu ihrer Trockenmasse liefern Fettsäuren doppelt so viel ATP wie Kohlenhydrate; sechsmal mehr, wenn man die gespeicherten Fettsäuren mit den gespeicherten Glykogenvorräten vergleicht (Carracedo *et al.* 2013). Fettsäuren können also zusätzliches ATP liefern.

Die *de novo* Synthese von Fettsäuren geht von Citrat aus, welches aus dem TCA entstammt. Dieses wird aus dem Mitochondrium ins Cytoplasma transportiert, wo es durch die ATP-Citrat-Lyase (ACLY) in Oxalacetat und Acetyl-CoA gespalten wird. Acetyl-CoA wird durch die Acetyl-CoA-Carboxylase zu Malonyl-CoA, welches als Substrat für die Fettsäure-Synthase (FASN) dient. FASN ist ein multifunktionales Enzym, welches aus Malonyl-CoA im Laufe mehrerer Reaktionen und unter Verbrauch großer Mengen NADPH schließlich Palmitat generiert (Tennant *et al.* 2010).

Die gesteigerte Expression einiger Gene im Lipidmetabolismus tritt immer wieder im Zusammenhang mit Tumorzellen auf. Ein Beispiel dafür ist das Enzym ACLY, welches die cytoplasmatische Spaltung von Citrat in Acetyl-CoA und Oxalacetat vermittelt. Eine Repression dieses Gens führt zur Einschränkung des Tumorwachstums und des Überlebens von Tumorzellen (Hatzivassiliou *et al.* 2005). Die Expression der Gene *ACACA* (Acetyl-CoA Carboxylase), welche Acetyl-CoA carboxyliert, um Malonyl-CoA zu erzeugen und *FASN* (Fettsäure-Synthase), welche für die Bildung von Palmitat zuständig ist, stehen ebenfalls im Zusammenhang mit dem Überleben von Tumorzellen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation dieser Gene in Brustkrebszellen zu einer starken Abnahme der Palmitat-Produktion führte, woraufhin die Apoptose induziert wurde (Chajès *et al.* 2006). Eine erhöhte Expression von *FASN* steht außerdem im Zusammenhang mit dem Auftreten eines Rezidivs und einer schlechteren Prognose von Brustkrebs-Patientinnen (Alo' *et al.* 1996). Der spezifische siRNA vermittelte *knockdown* von *FASN* induziert Apoptose in Prostata-Tumoren

(Bandyopadhyay *et al.* 2005). Im Gegensatz dazu induziert eine Überexpression von *FASN* invasive Adenokarzinome in humanen Prostata-Zellen und verhindert die Apoptose. In Prostata-Karzinomen ist die *FASN*-Expression mit der Apoptose-Rate invers assoziiert (Loda *et al.* 2009). Außerdem steht die erhöhte Expression von *FASN* mit einer kürzeren Überlebensrate von Patienten mit Kolon- und Ovarialkarzinomen in Verbindung (Gansler *et al.* 1997). Die Inhibition der *FASN* könnte also ein potentielles Target in der Krebstherapie darstellen, da die meisten Krebszellen auf die *de novo* Fettsäure-Synthese zurückgreifen, während die meisten nicht-Krebszellen bevorzugt exogene Fettsäuren nutzen (Currie *et al.* 2013). Allerdings scheint der gesteigerte Zelltod nach *FASN*-Inhibition vielmehr durch die toxische Akkumulation von Malonyl-CoA als durch das Fehlen von Fettsäuren bedingt zu sein (Pizer *et al.* 2000). Zusätzlich zeigten einige *FASN*-Inhibitoren schwere Nebenwirkungen im Tiermodell (Loftus *et al.* 2000). Außerdem wird die Funktion der *FASN* auch in adulten neuronalen Stammzellen benötigt (Knobloch *et al.* 2013).

Paradoxerweise scheint für Tumorzellen neben der Synthese von Fettsäuren deren Abbau ebenso wichtig zu sein. Die β -Oxidation wird neben der aeroben Glykolyse als zweiter dominanter bioenergetischer Stoffwechselweg in Tumoren angesehen und spielt beispielsweise in Prostatakarzinomen eine größere Rolle als die Glykolyse (Liu *et al.* 2010). Außerdem steht die Tumorpromotion im Pankreaskrebs im Zusammenhang mit einer gesteigerten mitochondrialen β -Oxidation von Fettsäuren (Khasawneh *et al.* 2009).

Bei der β -Oxidation werden freie Fettsäuren aus dem Cytoplasma an CoA gebunden, wodurch Acyl-CoA entsteht. Anschließend wird die Acyl-Gruppe unter Abspaltung des CoA auf Carnitin übertragen und in das Mitochondrium transportiert. Die eigentliche β -Oxidation findet dann im Mitochondrium statt, wo die Acyl-Ketten über sich wiederholende Runden von Oxidation und Hydratisierung abgebaut werden, wodurch NADH, FADH₂ und Acetyl-CoA entsteht. NADH und FADH₂ können im Rahmen der OXPHOS zur ATP-Produktion genutzt werden, während Acetyl-CoA dem Citratzyklus zugeführt werden kann (Santos & Schulze 2012).

Zusätzlich ist die β -Oxidation als eine wichtige Quelle für die Bildung von NADPH beschrieben, welches für anabole Prozesse nötig ist, aber auch um oxidativem Stress und dem damit verbundenen Zelltod entgegenzuwirken (Pike *et al.* 2011). Weitere diskutierte Gründe der Bedeutung der β -Oxidation sind die Eliminierung von potentiellen toxischen Lipiden (Vickers 2009; Samudio & Harmanecy 2010), die Inhibition pro-apoptotischer Signalwege (Paumen *et al.* 1997; Giordano *et al.* 2005) und die Bereitstellung metabolischer Intermediate für das Zellwachstum (Santos & Schulze 2012).

Veränderte Expressionen von Genen, die an der β -Oxidation beteiligt sind, treten ebenfalls im Zusammenhang mit Tumoren auf. Ein Beispiel ist das Gen *CPT1 α* , welches für die Übertragung

der Acyl-Gruppe auf Carnitin zuständig ist. *CPT1α* ist in einigen humanen Tumoren hochreguliert und siRNA-vermittelte Inhibition der Expression von *CPT1* macht die Zellen der Strahlentherapie und Apoptose-induzierenden Medikamenten zugänglich (Samudio & Harmancey 2010).

4.3.5 Einfluss des Tumormilieus

Neben genetischen Veränderungen führt auch das abnormale Tumormikromilieu zur Modifikation des Metabolismus einer Tumorzelle (Abbildung 4.2.). Da die meisten Tumore schlecht vaskularisiert sind, entsteht eine räumliche und zeitliche heterogene Verteilung von Sauerstoff, Glukose und anderen Metaboliten sowie Protonen (pH-Wert). Diese extremen Bedingungen ziehen eine Reihe zellulärer Veränderungen nach sich, die den metabolischen Phänotypen weiter beeinflussen und die Tumorprogression begünstigen (Lunt *et al.* 2008; Cairns *et al.* 2011). Die Modifikationen aufgrund von Hypoxie sind dabei am besten verstanden. Hypoxie induziert die Transkription verschiedener Glykolyse-assoziiierter Gene durch die Stabilisation von HIF, was, wie bereits beschrieben (siehe 4.2), die glykolytische Kapazität erhöht und die mitochondriale Respiration vermindert (Denko 2008). Dadurch werden die Zellen unabhängiger vom Sauerstoff. HIF stimuliert außerdem die Angiogenese und Vaskularisierung durch Aktivierung verschiedener Faktoren, inklusive des bekanntesten, VEGF (*vascular endothelial growth factor*), um der verminderten Sauerstoffverfügbarkeit entgegenzuwirken (Semenza 2000; Gatenby & Gillies 2004; Kioi *et al.* 2010). Hypoxie steigert auch die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (Hill *et al.* 2009) und dadurch Invasion (Pennacchietti *et al.* 2003) und Metastasierung (Chang *et al.* 2011). Zusätzlich gehört auch die Expressionsänderung von Genen, die Apoptose unterdrücken (Erler *et al.* 2004) und Autophagie unterstützen (Rouschop *et al.* 2010) zu Hypoxie-bedingten Modifikationen. Außerdem führt Hypoxie zu einem Verlust der Genom-Stabilität durch erhöhte Produktion von ROS (Duranteau *et al.* 1998; Vanden Hoek *et al.* 1998; Guzy *et al.* 2005) und der Herunterregulation von DNA-Reparaturmechanismen (Bristow & Hill 2008).

Ein weiteres Merkmal des pathophysiologischen Tumormikromilieus ist ein niedriger extrazellulärer pH-Wert und eine schlechte Versorgung mit Nährstoffen. Die genauen Zusammenhänge sind bisher schlecht erforscht, auch weil häufig alle drei Veränderungen, also Hypoxie, niedriger pH-Wert und schlechte Nährstoffversorgung gemeinsam vorkommen. Dennoch liegen Untersuchungen vor, die einen niedrigen pH-Werte und auch eine geringe Versorgung mit Glukose mit einer verstärkten Invasion bzw. Metastasierung in Verbindung bringen (Schlappack *et al.* 1991; Jang & Hill 1997; Rofstad *et al.* 2006). Ebenso wie das

Mikromilieu zelluläre Veränderungen nach sich zieht, beeinflusst auch umgekehrt ein veränderter Tumormetabolismus das Mikromilieu (Abbildung 4.2.).

Die Besonderheiten im Tumorstoffwechsel können zum einen zur Tumordiagnostik verwendet werden, zum anderen ist ein wachsendes Forschungsfeld die Manipulation des Tumorstoffwechsels zu therapeutischen Zwecken (Sattler *et al.* 2010). Dies ist möglich, da sich der Metabolismus von Tumorzellen maßgeblich von normalen Zellen unterscheidet.

Im Folgenden werden die Möglichkeiten der pharmakologischen Modulation genauer beschrieben, die im Rahmen dieser Arbeit angewandt wurden.

4.4 Pharmakologische Möglichkeiten zur Modulation des Stoffwechsels

Der gesteigerte Glukoseverbrauch und vor allem die Metabolisierung in der aeroben Glykolyse ist eines der Hauptunterschiede im Katabolismus zwischen Tumorzellen und nicht-Tumorzellen. Der glykolytische Phänotyp von Tumorzellen bietet eine Reihe potentieller Vorteile. Zum einen macht es die Tumorzellen, die zumindest in frühen Stadien nicht vaskularisiert sind und deshalb von der Versorgung von Sauerstoff abgeschnitten sind, unabhängig von Sauerstoff. Außerdem führt die Azidifizierung des Mikromilieus zu einem Wachstumsvorteil der Tumorzellen, zum einen durch die Zerstörung und Verdrängung benachbarter Normalgewebe und zum anderen durch die säureinduzierte Zerstörung der ECM (extrazellulären Matrix), die normalerweise das Wachstum der Zellen kontrolliert (Gatenby & Gillies 2004). Außerdem ist beschrieben, dass der niedrige pH-Wert Invasion und Metastasenbildung durch einen noch nicht bekannten Mechanismus induziert (Schlappack *et al.* 1991; Martinez-Zaguilan *et al.* 1996). Die Inhibition der gesteigerten aeroben Glykolyse und das Steigern der OXPHOS in malignen Zellen ist deshalb eine vielversprechende Option der Anti-Krebs-Therapie. Neben der gesteigerten Glykolyse weisen Krebszellen auch noch weitere deregulierte Stoffwechselwege auf. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Stoffwechselmodulatoren beschrieben (Abbildung 4.4.)

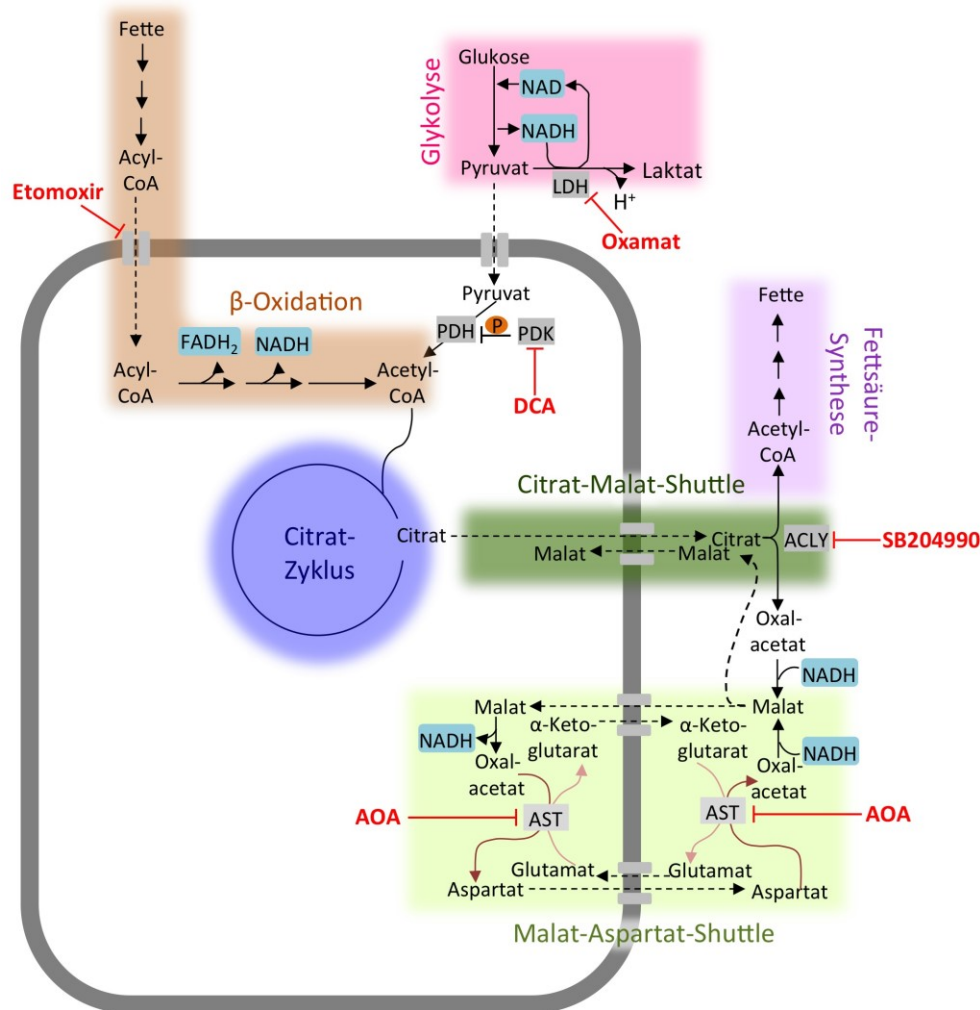


Abbildung 4.4. Übersichtsabbildung über Möglichkeiten der Modulation des Tumorstoffwechsels.

Die detaillierte Beschreibung ist in den nachfolgenden Kapiteln zu finden. ACLY=ATP-Citrat-Lyase, AOA=Aminooxyacetat, AST=Aspartat-Aminotransferase, DCA=Dichloracetat, LDH=Laktat-Dehydrogenase, PDH=Pyruvat-Dehydrogenase, PDK=Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase

4.4.1 Modulation des Tumorstoffwechsels durch den Einsatz von Dichloracetat

Eine Möglichkeit der metabolischen Manipulation ist der Einsatz von Dichloracetat (DCA). DCA, ein Strukturanalogon von Pyruvat, stimuliert indirekt die Aktivität der PDH (Pyruvat-Dehydrogenase). Die PDH decarboxyliert Pyruvat zu Acetyl-CoA und macht dieses damit dem Citratzyklus und der OXPHOS im Mitochondrium zugänglich. Seine Regulation erfolgt über eine aus vier Mitgliedern bestehende Familie an PDKs, die die PDH inhibitorisch phosphorylieren und zwei PDPs, die durch ihre Dephosphorylierung wieder zu einer Aktivierung der PDH führen (Huang *et al.* 2003). Die Aktivierung der PDH durch DCA erfolgt deshalb indirekt über die Inhibition der PDKs (Abbildung 4.4.).

DCA gilt als vielversprechendes Medikament in der Krebstherapie. Zum einen zeigt die Behandlung einer Vielzahl von Tumoren im Tiermodell mit DCA eine hohe Effizienz durch die Induktion von Apoptose und die Verminderung der Proliferationsrate bei geringer Toxizität für nicht-Tumorzellen (Bonnet *et al.* 2007; Cao *et al.* 2008; Wong *et al.* 2008). Zum anderen ist DCA mit 150 Da ein sehr kleines Molekül, was seine Bioverfügbarkeit verbessert und dazu führt, dass es an jeden Wirkort, inklusive des Gehirns, vordringen kann (Michelakis *et al.* 2008). Die Gabe von DCA reduziert Laktat-Level um bis zu 60 % als direktes Ergebnis der PDK Inhibition und damit der direkten 3- bis 6- fachen PDH-Aktivierung (Howlett *et al.* 1999; Parolin *et al.* 2000). Durch die DCA Behandlung steigt der Sauerstoffverbrauch in den Tumorzellen dramatisch an und steigert die Effizienz von Hypoxie-spezifischen Chemotherapeutika (Tirapazamin) (Cairns *et al.* 2007).

4.4.2 Modulation des Tumorstoffwechsels durch den Einsatz von Oxamat

Eine weitere Möglichkeit, den Stofffluss von der aeroben Glykolyse hin zur Glukose-Oxidation umzuleiten, ist die Blockade der LDH. Durch siRNA-vermittelten *knockdown* der LDH, was den Transport von Pyruvat in das Mitochondrium und dessen Metabolisierung über OXPHOS fördert, konnte bereits ein vermindertes Tumorwachstum und eine gesteigerte Apoptose der Tumorzellen gezeigt werden (Fantin *et al.* 2006). Zusätzlich besteht aber auch die Möglichkeit der LDH-Inhibition über Oxamat (Abbildung 4.4.). Oxamat ist ein Strukturanalogen zu Pyruvat und konkurriert mit ihm um die Bindestelle an der LDH (Hakala *et al.* 1955). Durch die Inhibition der LDH wird die Laktatproduktion gesenkt und die Reduktion der aeroben Glykolyse konnte bereits mehrfach bestätigt werden (Elwood 1968; Lu *et al.* 2014; Miskimins *et al.* 2014). Die inhibierende Wirkung von Oxamat auf das Wachstum von Tumorzellen wurde in diversen Arbeiten bestätigt (Hamilton *et al.* 1995; Fiume *et al.* 2010). Zusätzlich steigert Oxamat die Wirkung des Chemotherapeutikums Paclitaxel (Hemmung der Mitosespindel-Degradation) und resensitiviert chemoresistente Brustkrebs-Zelllinien (Zhou *et al.* 2010).

4.4.3 Modulation des Tumorstoffwechsels durch den Einsatz von Etomoxir

Die β -Oxidation gilt als der dominante Stoffwechselweg in nicht-glykolytischen Tumoren (Liu *et al.* 2010; Caro *et al.* 2012; Li & Cheng 2014) und auch in glykolytischen Tumoren ist die OXPHOS nicht komplett heruntergefahren (Cairns *et al.* 2011). Die Carnitin-Palmitoyl-Transferasen (CPT1 vgl. 4.3.4), welche die β -Oxidation regulieren, stehen im Verdacht eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel einiger Tumore zu spielen (Cairns *et al.* 2011). Diese bewerkstelligen den Transport von Fettsäuren aus dem Cytoplasma in das Mitochondrium, wo

der Abbau der Fettsäuren über die β -Oxidation Reduktionsäquivalente liefert. Die Reduktionsäquivalente können wiederum in der Atmungskette über OXPHOS zur ATP-Produktion genutzt werden. Die β -Oxidation kann für Tumorzellen einen alternativen Stoffwechselweg bieten, der Wachstum und Überleben fördert (Tirado-Vélez *et al.* 2012).

Etomoxir ist ein potenter indirekter Inhibitor der β -Oxidation (Abbildung 4.4.). Es inhibiert diese irreversibel, indem es die Konversion von Palmitoyl-CoA zu Palmitoylcarnitin durch die CPT1 an der äußeren Mitochondrienmembran hemmt. Dadurch ist der Transport von Palmitoylcarnitin in das Mitochondrium nicht mehr möglich und die Fettsäuren stehen zur ATP-Generierung nicht mehr zur Verfügung (Kruszynska & Sherratt 1987; Selby & Sherratt 1989). Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass Etomoxir die intrazellulären ATP-Level senkt und dadurch Überleben, Wachstum und Resistenz auf Chemotherapeutika reduziert (Samudio & Harmancey 2010; Pike *et al.* 2011; Tirado-Vélez *et al.* 2012). Einhergehend mit dieser Beobachtung zeigten *CPT1*-depletierte Tumorzellen *in vivo* ein verringertes tumorigenes Potential. Außerdem reagieren sie wesentlich sensitiver auf metabolischen Stress (Zaugg *et al.* 2011). Die Inhibition der β -Oxidation konnte in Leukämiezellen und im Glioblastom Apoptose induzieren (Samudio & Harmancey 2010; Pike *et al.* 2011).

4.4.4 Modulation des Tumorstoffwechsels durch den Einsatz von SB204990

Ein weiterer wichtiger Stoffwechselweg von Tumorzellen ist die Fettsäuresynthese. Ging man ursprünglich nur von einer großen Bedeutung der Fettsäuresynthese im Bezug auf anabole Prozesse aus, wird sie heute mehr und mehr auch mit aggressivem Tumorverhalten, Wachstum und Überleben assoziiert. Aus diesem Grund rückt die Fettsäuresynthese immer mehr in den Mittelpunkt der Krebsforschung und dient als Ansatzpunkt für Tumordiagnostik und in der Krebstherapie (Kuhajda 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Krebszellen sehr stark von der *de novo* Lipidsynthese abhängig sind und dass die Expression und/oder Aktivität vieler Fettsäure-Synthese-assoziierten Enzyme, darunter ATP-Citrat-Lyase (ACLY), Acetyl-CoA Carboxylase (ACACA) und Fettsäure-Synthase (FASN), in vielen Krebsarten hochreguliert sind (Menendez & Lupu 2007; Tennant *et al.* 2010). Die Aktivität der ACLY ist wesentlich höher in Lungentumoren im Vergleich zu normalem Lungengewebe und mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Migita *et al.* 2008). Die ACLY spaltet das aus dem Citratzyklus kommende Citrat in Acetyl-CoA und Oxalacetat (vgl. 4.3.4.) Acetyl-CoA kann anschließend zur Fettsäuresynthese genutzt werden. SB204990 ist ein wirkungsvoller Inhibitor der ACLY (Abbildung 4.4.). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz von SB204990

Proliferation und Überleben von Tumorzellen *in vitro* und Tumorwachstum *in vivo* limitiert (Hatzivassiliou *et al.* 2005).

4.4.5 Transportsysteme für cytoplasmatisches NADH

Die Bildung von Laktat hat außerdem zur Folge, dass NADH zu NAD⁺ reoxidiert wird. Das NAD⁺ steht dann wieder für die Glykolyse als Elektronenakzeptor zur Verfügung, wodurch diese weiter ablaufen kann. Neben der Laktatbildung gibt es aber auch noch weitere Möglichkeiten NADH cytoplasmatisch zu NAD⁺ zu reoxidieren. Nachdem eine gesteigerte Glykolyserate in Krebszellen seit langem bekannt ist, rückt die mitochondriale Oxidation von glykolytisch generiertem NADH und die Erforschung der Shuttlesysteme für den Transport von NADH aus dem Cytosol in das Mitochondrium immer mehr in den Fokus.

Hierfür stehen verschiedene Transportsysteme zur Verfügung. Der Citrat-Malat-Shuttle (Kornacker & Ball 1965) ist eine Möglichkeit NADH in die Mitochondrienmatrix zu transportieren. Hierbei wird Citrat durch die ACLY zu Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten. Anschließend wird das Oxalacetat unter NADH-Verbrauch zu Malat. Hierbei entsteht cytoplasmatisch NAD⁺. Das Malat kann dann durch den Citrat-Malat-Shuttle ins Mitochondrium zurücktransportiert werden, wo es wieder in den Citrat-Zyklus gerät. Malat wird nun zu Oxalacetat oxidiert. Dabei wird NAD⁺ zu NADH reduziert, welches im Zuge der OXPHOS zur ATP-Produktion genutzt werden kann. Die Inhibition der ACLY durch SB204990 bietet eine Möglichkeit, die Nutzung des Citrat-Malat-Shuttles zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit cytoplasmatisches NADH in die Mitochondrienmatrix zu transportieren ist der Malat-Aspartat-Shuttle (Berg *et al.* 2007). Hierbei wird zunächst Oxalacetat NADH-abhängig durch die cytosolische Malat-Dehydrogenase zu Malat reduziert. Das gebildete Malat wird durch einen α -Ketoglutarat-Malat-Carrier im Austausch gegen α -Ketoglutarat in die Mitochondrienmatrix transportiert. Im Inneren des Mitochondriums wird das Malat durch die mitochondriale Malat-Dehydrogenase wieder zu Oxalacetat oxidiert, wobei NAD⁺ zu NADH reduziert wird. Die eigentliche Transportfunktion ist damit bereits erfüllt. Zur Aufrechterhaltung des Zyklus sind jedoch noch weitere Schritte nötig. Deshalb wird das im Mitochondrium befindliche Oxalacetat durch die AST (Aspartat-Aminotransferase) Glutamat-abhängig zu Aspartat aminiert, wobei Glutamat zu α -Ketoglutarat wird. Das hierzu notwendige Glutamat stammt aus dem Cytosol und gelangt in das Mitochondrium, indem es durch den Aspartat-Glutamat-Carrier gegen das entstandene Aspartat ausgetauscht wird. Cytosolisches Aspartat wird wiederum durch die AST zu Oxalacetat, wobei α -Ketoglutarat, welches im Austausch gegen Malat ins Cytosol transportiert wurde, in Glutamat umgewandelt. Ziel des

Shuttles ist es, das aus der Glykolyse stammende NADH in die Mitochondrien zu transportieren, wo es zur Energiegewinnung über OXPHOS genutzt werden kann und dass NAD⁺ für die Glykolyse wieder zur Verfügung steht (Berg *et al.* 2007).

Die Blockade des Malat Aspartat-Shuttles ist mit Hilfe des Inhibitors Aminoxyacetat (AOA) möglich, welcher die Aspartat-Transaminase hemmt (Kauppinen *et al.* 1987) (Abbildung 4.4). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Malat-Aspartat-Shuttle, aber auch der Citrat-Malat-Shuttle, eine große Rolle im Transport der cytoplasmatischen Reduktionsäquivalente in das Mitochondrium spielt (Eboli & Galeotti 1981). Über Auswirkungen von AOA auf das Tumorwachstum ist bisher noch wenig bekannt.

4.5 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung tumorspezifischer Stoffwechselwege als mögliche Angriffspunkte neuer Therapieansätze. Für die Entwicklung solcher zielgerichteter Therapien müssen zunächst die Eigenschaften des tumorspezifischen Metabolismus genau charakterisiert werden.

Aus diesem Grund wird der metabolische Phänotyp der patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen (OC-Zellen) im Vergleich zu etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A herausgearbeitet. Dafür werden zum einen Expressionslevel vieler Metabolismus-assoziiierter Gene untersucht und Präferenzen der Zellen für bestimmte Stoffwechselwege abgeleitet. Zum anderen werden aber auch die metabolischen Parameter OCR (oxygen consumption rate) und ECAR (extracellular acidification rate) sowie deren Kapazitäten unter Normalbedingungen und unter Einfluss von metabolischem Druck mit Hilfe des Seahorse-XFe-Analyzers untersucht. Außerdem soll der metabolischen Effekt von Stoffwechselmodulatoren auf die Proliferation übertragen und die Auswirkungen mit Hilfe des xCELLigence RTCA dokumentiert werden. Hierbei wird die initiale Implementierung der beiden Geräte in den Arbeitsprozess eine zentrale Rolle spielen.

Bis heute ist der Einsatz von Einzelwirkstoffen nicht zufriedenstellend, da dieser hohe Dosen erforderte, um eine Wirkung zu erzielen, und dadurch starke Nebenwirkungen verursacht (Sattler *et al.* 2010). Aus diesem Grund sollen die Konzentrationen der einzelnen Modulatoren auf ein Mindestmaß herabgesetzt werden und stattdessen auf eine Kombination verschiedener Inhibitoren des Stoffwechsels zurückgegriffen werden. Zudem soll überprüft werden, ob durch die Modulatoren eine erhöhte Sensitivität für Chemotherapeutika erzeugt werden kann.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte

Autoklaven Bioclav und Fedegari	Schütt, Olching
Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader	Bio-Rad, München
Brutschrank BBD6220 (CO ₂ -begasbar, 37°C)	Heraeus, Hanau
Cellometer Auto X 400	Nexcelom Bioscience, USA
Celltron (Horizontalschüttler)	Infors HT, Bottmingen (Schweiz)
Einfrierbox Nalgene Cryo	Neerijse, Belgien
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
ELISA-Reader SPECTRA MAX340	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorf Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage Sartorius Research R200D	Sartorius, Göttingen
Heizblock HBT 130	HLC, Göttingen
Horizontalschüttler	Heidolph, Schwabach
Infinite M200	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Kühlzentrifuge J2-21 M/E mit Rotor JA-20	Beckmann, München
Leica DMIL LED Mikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Magnetrührer MR2002 und MR3001 (beheizbar)	Heidolph, Schwabach
Mikrowellengerät Privileg 7533P	Quelle, Fürth
Milli-Q Water System	Millipore, Eschborn
Multifuge 3L-R (Kühlzentrifuge)	Heraeus, Hanau
Multiscan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Hamburg
Mx3000P qPCR System	Stratagene (Niederlande)
NanoDrop ND-1000	PeqLab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
pH-meter Inolab	Inolab, Weilheim
Pipetboy Acu	Integra Bioscience GmbH, Fernwald
Pipetten Research	Eppendorf, Hamburg
Seahorse XFe96 Analyzer	Agilent technologies, Santa Clara (USA)
Sterilbank LaminAir HA2448	Heraeus, Hanau
Stickstofftank Chronos Biosafe	Active motif, Carlsbad (USA)
Überkopftrotierer für 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße	Heidolph, Schwabach
Universalwaage Scout Pro	Ohaus, Pine Brook (USA)
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad 1003	GFL (Gesellschaft für Labortechnik), Burgwedel
xCELLigence RTCA DP	Omni Life Science, Bremen

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Adhesive PCR-Verschlussfolie	Thermo Fisher Scientific, Hamburg
E-Plate 16 für xCELLigence DP	Omni Life Science, Bremen
Kyroröhrchen 1 ml	Nunc, Wiesbaden M
Mikrotiterplatte 96 <i>well</i> UV	Corning, New York (USA)
Mikrotiterplatte 96 <i>well</i>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Parafilm	Sarstedt, Nümbrecht
(USA) Pasteurpipetten	American National Can™, Neenah
Pipettenspitzen	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 ml + 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Primaria™ Zellkulturschalen (6 und 10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml & 2 ml	Corning, New York (USA)
Seahorse XFe96 FluxPaks	Sarstedt, Nümbrecht
Steritop Express Plus-Filter (0,22 m)	Agilent technologies, Santa Clara (USA)
Thermo-Fast 96 PCR Plate in weiß	Millipore, Bedford (USA)
Zellkulturplatten 6-, 12-, 24- 48- u. 96- <i>well</i>	Thermo Fisher Scientific, Hamburg
Zellkulturschalen 6 cm, 10 cm und 15 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

5.1.3 Chemikalien

2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Deoxyglucose (2-DG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acetyl-CoA	Sigma-Aldrich, Steinheim
all- <i>trans</i> retinoic acid	Sigma-Aldrich, Steinheim
AntimycinA	Santa Cruz Biotechnology, Dallas
AOA	Sigma-Aldrich, Steinheim
(O-(Carboxymethyl)hydroxylamine hemihydrochloride)	
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, Steinheim
cis-Aconitat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytochrom-c (bovines)	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-Glucose (1,2- ¹³ C ₂ , 99%)	Cambridge Isotope Laboratories, Andover (USA)
Decylubiquinone (DBQ)	Enzo Biochem, New York (USA)
Dichloracetat (DCA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dichlorphenol-Indophenol (DCPIP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Digitonin	MP Biomedicals, Eschwege
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim

Dodecylmaltosid (DDM)	Merck, Darmstadt
Epidermal growth factor (EGF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
	Thermo Fisher Scientific, Hamburg
Ethanol absolut (EtOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin Tetraacetat (EDTA)	Gerbu, Gaiberg
Etomoxir	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCCP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas
Glutamine-L U- ¹³ C ₅	Cambridge Isotope Laboratories, Andover (USA)
HEPES 1M	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hydrocortison	Gerbu, Gaiberg
	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin (bovin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin (human, recombinant)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isocitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isocitrat-Dehydrogenase (porcine)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumcyanid (KCN)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe
Linolsäure	Cayman Chemical, Michigan (USA)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Riedel-de Haën, Seelze
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MTT-Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
n-Decylubiquinone	Sigma-Aldrich, Steinheim
NAD	Carl Roth, Karlsruhe
NADP	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Norvalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
O-phosphoryl ethanolamine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oligomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oxalacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethansulfonyl fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatase-Inhibitor	Merck Chemicals, Darmstadt
Poly (2-hydroxyethyl methacrylate)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protease-Inhibitor	Merck Chemicals, Darmstadt
Rotenone	VWR International, Darmstadt
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SB204990	Bio Techne, Minneapolis (USA)
Selenous acid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sodium Malonate	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sodium Oxamat	Sigma-Aldrich, Steinheim

Sodium Pyruvate 3- ¹³ C	Cambridge Isotope Laboratories, Andover (USA)
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Sodium-Pyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sodium-Succinat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Transferrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triiodothyronine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trishydroxymehtylaminomethan (Tris-Base)	Acros Organics (Belgien)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Flow Laboratories, Irvine (Schottland)

5.1.4 Puffer und Lösungen

Sofern nicht ausdrücklich vermerkt, wurden die folgenden Puffer und Lösungen in MilliQ-Wasser angesetzt und anschließend sterilfiltriert.

5.1.4.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

H ₂ O	Milli-Q gereinigt und autoklaviert
H ₂ O (RNase und DNase-frei)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS „Phosphate buffered saline“	Invitrogen, Karlsruhe
MAGPIX® Drive Fluid	Thermo Fisher Scientific, Hamburg

5.1.4.2 Puffer und Lösungen für Seahorse-Messungen

Seahorse XF Calibrant Solution	Agilent technologies, Santa Clara (USA)
--------------------------------	---

KHB	111 mM Natriumchlorid (NaCl) 4,7 mM Kaliumchlorid (KCl) 2 mM Magnesiumsulfat (MgSO ₄) 1,2 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) pH 7,4
-----	---

Zur Verwendung im Assay wird KHB frisch mit 5 mM HEPES (pH 7,4) supplementiert und je nach Versuch 20 mM Glukose und/oder 2 mM Glutamin hinzugegeben.

<i>low-buffered</i> DMEM	DMEM (<i>low-buffered</i>) 1,85g/l Natriumchlorid (NaCl) pH 7,35 +/- 0,05
--------------------------	---

low-buffered DMEM wird zur Verwendung in der Messung mit 2 mM Glutamin und/oder 20 mM Glukose frisch angesetzt.

5.1.4.3 Lösungen zur Herstellung von Proteinextrakten

FLAG-Lysepuffer	60 mM Tris pH 7,5
	30 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 % Triton X-100

5.1.4.4 Lösungen für Enzymaktivitätsassays

Mito-Buffer	5 mM Tris pH 7,4
	250 mM Saccharose
	1,5 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂)
Digi-Buffer	0,01 % Digitonin in Mito-Buffer
	1 mM PMSF
	immer frisch ansetzen
Aconitase-Assay-Puffer bzw. Isocitrat-Dehydrogenase-Assay-Puffer	100 mM Triethanolamin pH 8,0
	1,5 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂)
	0,1 % Triton X-100
Citrat-Synthase-Assay-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	100 mM Natriumchlorid (NaCl)
	0,5 mM DTNB (gelöst in DMSO)
	0,1 % Triton X-100
Lactat-Dehydrogenase-Assay-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,4
	1 mM EDTA
	0,1 % Triton X-100
Succinate-Dehydrogenase Assay-Puffer	50 mM Tris/SO ₄ pH 7,4
	0,1 mM EDTA
	70 µM Dichlorphenol-Indophenol (DCPIP)
	0,1 % Triton X-100
Cytochrom-c-Oxidase-Assay-Puffer	50 mM MES, pH 6,6
	50 mM NaCl
	1 % BSA
	0,5 mM Dodecylmaltoside (DDM)

5.1.4.5 Lösungen für den MTT-Test

MTT-Reagenz	5 mg MTT-Reagenz In 1 ml PBS
Solubilisierungsreagenz	10 % SDS in 0,01 M HCl

5.1.4.6 Medien für Zellkultur

DMEM mit L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM/Ham's F12	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM/Ham's F12 mit stabilem Glutamin	Biochrom, Berlin
DMEM (<i>low-buffered</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim Biochrom, Berlin
M199 Medium mit stabilem Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Hamburg
McCoy's 5a Medium Modified	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100x) (Penicillin 10.000 U/ml; Streptomycin 10 mg/ml)	Sigma- Aldrich,Steinheim
Pferdeserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 (ohne Phenolrot)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

5.1.5 Verwendete Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen untersucht werden und mit etablierten Zelllinien zum Zwecke der Modellsystemetablierung verglichen werden. Zusätzlich dient der Vergleich mit der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A als Referenz für nicht-Tumorzellen.

Alle untersuchten patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen, die im Folgenden als OC-Zellen bezeichnet werden (Tabelle 5.2.) gehören hauptsächlich zu den hochgradig serösen Tumoren und besitzen alle eine TP53-Mutation. Der Ursprung der etablierten Zelllinien ist im Folgenden in den Tabellen angegeben (Tabelle 5.1. und Tabelle 5.2.).

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % in einem mit 5 % CO₂ begasten Inkubator auf 10 cm Zellkulturschalen kultiviert.

Tabelle 5.1. Name, Herkunft, Zelltyp und Kulturmedium der verwendeten etablierten Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Zelltyp	Kulturmedium
SKOV-3	ATCC-HTB-77	humane, klarzellige Ovarialkarzinomzellen (Shaw <i>et al.</i> 2004)	McCoy's 5a Medium Modified 10 % FCS
OVCAR-3	ATCC-HTB-161	humane, " <i>high-grade</i> " ovariale Adenokarzinomzellen (Hamilton <i>et al.</i> 1983; Domcke <i>et al.</i> 2013)	RPMI 1640 20 % FCS 0,01 mg/ml bovines Insulin
IGROV-1	T. Hagemann	Humane, " <i>low-grade</i> " seröse ovariale Adenokarzinomzellen (Bénard <i>et al.</i> 1985; Domcke <i>et al.</i> 2013)	RPMI 1640 20 % FCS 2 g/l NaHCO ₃
HEY	Frauenklinik UKGM	Humane, papilläre Zystadenokarzinomzellen (Buick <i>et al.</i> 1985; Shaw <i>et al.</i> 2004; Domcke <i>et al.</i> 2013)	DMEM 10 % FCS
A549	ATCC-CCL-185	Humane, Lungentumorzellen	DMEM 10 % FCS
HeLa	EMBL Heidelberg	Humane, epitheliale Zervixkarzinomzellen	DMEM 10 % FCS
MCF-7	ATCC-HTB-22	Humane, Brustdrüsenkrebszellen	DMEM 10 % FCS
MCF-10A	ATCC-CRL-10317	Humane, nicht-tumorigene Brustepithelzelllinie	DMEM/F12 5 % Pferdeserum 20 ng/ml EGF 0,5 µg/ml Hydrocortison 100 ng/ml Choleratoxin 10 µg/ml humanes Insulin

Tabelle 5.2. Klinische Daten zu den Verwendeten OC-Zellen

Patienten – ID	etabliert aus Aszites-abgeleiteten	Alter der Patientin	histologisches Grading
OC_38	Einzelzellen	53	G2
OC_91	Sphäroiden <30µm	63	G3
	Sphäroiden >30µm		
OC_92	Sphäroiden >30µm	64	G4
OC_108	Sphäroiden >30µm	66	G4
OC_119	Sphäroiden >30µm	76	G3
OC_122	Sphäroiden >30µm	77	G4
OC_128	Sphäroiden >30µm	61	G4

Die Unterteilung der Tumorgewebe erfolgte gemäß UICC (Union Internationale Contre le Cancer) (G2= mäßig differenziertes bösartiges Gewebe, G3= schlecht differenziertes bösartiges

Gewebe, G4= undifferenziertes Gewebe, der Tumor kann nicht mehr, oder nur aufgrund immunhistochemischer Untersuchungen einem Ausgangsgewebe zugeordnet werden).

5.1.6 Verwendete vorgefertigte Systeme (Kits)

Absolute QPCR SYBR Green Mix	Thermo Fisher Scientific, Hamburg
Glycogen Assay Kit II	Abcam, Cambridge (UK)
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
Multi-Species PDH Complex Magnetic Bead Panel	EMD Millipore, Billerica (USA)
NUCLEOSPIN RNA II	Macherey-Nagel, Düren
Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit	Agilent technologies, Santa Clara (USA)
Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kit	Agilent technologies, Santa Clara (USA)

5.1.7 qPCR-Primer für Expressionsanalysen

Alle verwendeten Primer (Tabelle 5.3.) sind gegen Gene aus dem humanen Genom gerichtet und wurden mit Hilfe des “Universal ProbeLibrary Assay Design Centers“ von Roche (Basel, Schweiz) erstellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer auf zwei verschiedenen, durch ein Intron getrennten Exons liegen, damit nur mRNA Transkripte amplifiziert werden und nicht genomische DNA. Die Länge der Amplifikate beträgt nicht mehr als 300 bp und sowohl Synthese als auch Aufreinigung wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) durchgeführt. Nach der Lieferung im lyophilisierten Zustand wurden die Primer in H₂O gelöst, sodass die Stammkonzentration 100 µM betrug. Gelagert werden die Primer bei -20°C.

Tabelle 5.3. Verwendete Primer

Genname	Beschreibung	Sequenz 5'-3' Orientierung
ACAA2	3-Ketoacyl-CoA-Thiolase	GTCCCCACACCACAGAC
		TCGCTTAGCAGCAACTACAAA
ACACA	Acetyl-CoA-Carboxylase α	GCTGGTCCACATGAACAGG
		GCCTTCTGGATATTCAGGACTTT
ACLY	ATP-Citrat-Lyase	CCAGCAGGACAGCATCTTTT
		GGATCTTGGACTTGGGACTG
ACO2	Aconitase 2	GTGTAGACTCCATCTCCTGCACT
		TGTGGTTGTAAGGGAACACG
ATP5H	ATP-Synthase	CCCACTCCGTTACTTGCTG
		GTTTTCGCCCAGCCATTT
CPT1A	Carnitin-Palmitoyltransferase 1A	CAATCGGACTCTGGAAACG
		CCGCTGACCACGTTCTTC
CS	Citrat-Synthase	GGGGCCATTGACTCTAACCT
		TACATTGCCACCCTCATGG

<i>ETFA</i>	Elektron-Transfer-Flavoprotein α	AATATCTGGAGCCATCCAACA
		TGGGTCTTTATTAATTGCCAC
<i>ETFB</i>	Elektron-Transfer-Flavoprotein β	TGACCTGAGGCTCAACGAG
		TTGGAGGTCAGGTCCACAC
<i>FASN</i>	Fettsäure-Synthase	CAGGCACACACGATGGAC
		CGGAGTGAATCTGGGTTGAT
<i>FH</i>	Fumarat-Hydratase	GCACAGATCATCAAGATTGGAC
		TTGTTGAACATAACCACTAAATTCCT
<i>GLUT1</i>	Glukosetransporter Typ 1	AACTCTTCAGCCAGGGTCCAC
		CACAGTGAAGATGATGAAGACGTAGGG
<i>GLUT3</i>	Glukosetransporter Typ 3	CTTCGTCAACCGCTTTGGCAG
		TAACCAAGCGACCCAGGATCAG
<i>HK2</i>	Hexokinase 2	TCCCCTGCCACCAGACTA
		TGGACTTGAATCCCTTGGTC
<i>IDH2</i>	Isocitrat-Dehydrogenase 2	TGGCAGTTCATCAAGGAGAA
		GGAGCCCGAGGTCAAAATAC
<i>IDH3a</i>	Isocitrat-Dehydrogenase 3a	TTTTTGATGCTGCCAAAGC
		TTCCTCCAGGTCCTTGAATG
<i>LDHA</i>	Laktat-Dehydrogenase A	GCAGATTTGGCAGAGAGTATAATG
		GACATCATCCTTTATTCCGTAAAGA
<i>LDHB</i>	Laktat-Dehydrogenase B	GATGGATTTTGGGGGAACAT
		AACACCTGCCACATTCACAC
<i>MCT1</i>	Monocarboxylat-Transporter 1	GCAGCTTCTTTCTGTAACACCGT
		GTCGCCTCTGTAGAAATACTTGCC
<i>MCT4</i>	Monocarboxylat-Transporter 4	GGCCCTGCCAATGATTGCT
		GCATCAGAGGGACGAAGAAGAGGA
<i>MDH2</i>	Malat-Dehydrogenase 2	CGTGACGACCCTGGACAT
		TGACAGGGACGTTGACTCG
<i>ME3</i>	Malatenzym 3	CTTCCTCCTGACAGCAGAGC
		GTCTCCCCTGGGACAGATG
<i>MLYCD</i>	Malonyl-CoA-Carboxylase	TCGTCAAGGAGTTGCAGAGA
		GCTCCTTCGTTTGCGAGTT
<i>PDHA1</i>	Pyruvat-Dehydrogenase $\alpha 1$	CCTGACTTTATATGGCGATGG
		CTGCCATGTTGTAAGCTTCG
<i>PDK1</i>	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1	CATGTCACGCTGGGTAATGA
		ACACGAGGTCTTGGTGCACT
<i>PDK2</i>	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 2	AGATCAACCTGCTTCCCGAC
		GGAACCTCATGATGTCCAGG
<i>PDK3</i>	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 3	ACAGCCAAGATGCTGTGTGA
		TATGAAACAGATGTGAGGGCAC
<i>PDK4</i>	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 4	TTATACATACTCCACTGCACCA
		ATAGACTCAGAAGACAAAGCCT
<i>PKM2</i>	Pyruvat-Kinase M2	GCCGTTCTTCCAGATCA
		GTCCCGGCTTCACTATGG

<i>RPL27</i>	60S ribosomales Protein L27	AAAGCTGTCATCGTGAAGAAC
		GCTGTCACTTTGCGGGGGTAG
<i>SDHB</i>	Succinat-Dehydrogenase B	GACACCAACCTCAATAAGGTCTC
		GGCTCAATGGATTTGTACTGTGC
<i>SDHC</i>	Succinat-Dehydrogenase C	TCCTCTGTCTCCCCACATTACT
		TTCCTAGGTCCCACATCTGC
<i>SLC25A20</i>	Carnitin-Acylcarnitin-Translocase	GTTATCTGGCGTATTCACCACA
		GTCCAGTGTACTTGCTTTCTCC
<i>SUCLG1</i>	Succinyl-CoA-Ligase	TTCACCAAACAACGCAAGTT
		TAAAAGGATCACCTCCAATGC
<i>UQCRH</i>	Ubiquinol-Cytochrom-C-Reduktase	GAGCTCTGTGATGAGCGTGT
		ATTTCAGTTGTTAAAGAGTTTGTGG

Die Primer zur Detektion einer Mycoplasmenkontamination lauten (5'- 3'Orientierung) (Van Kuppeveld *et al.* 1992) .

TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC (*forward*) und ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA (*reverse*)

5.1.8 Sterilisation von Lösungen und Gebrauchtwaren

Die Gebrauchsmaterialien (Spitzen, Reaktionsgefäße, Glaswaren) und die hitzebeständigen Gebrauchslösungen werden, um eine Kontamination durch Mikroorganismen zu verhindern 20 min bei feuchter Hitze bei 121°C und 10⁵ Pascal autoklaviert. Lösungen, die durch dieses Verfahren Schaden nehmen würden, werden mit einem Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert.

5.1.9 Computerprogramme und Datenbanken

Analyse Software NanoDrop 3.01	PeqLab, Erlangen
Bio-Plex Manager™ MP	Bio-Rad, Wien
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, La Jolla (USA)
Microsoft Office 2008 (Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft, Unterschleißheim
Mx3000P Betriebs- und Analysesoftware	Stratagene (Niederlande)
RTCA Software 2.0	ACEA Bioscience, San Diego (USA)
Wave Desktop Software	Agilent technologies, Santa Clara (USA)
Wave Controller for Seahorse XFe Analyzers	Agilent technologies, Santa Clara (USA)
Ascent Software für Multiscan Ascent Version 2.6	Thermo Fisher Scientific, Hamburg

5.2 Methoden

5.2.1 Zellbiologische Methoden

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einem Arbeitsplatz mit Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, herrschten sterile Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten bzw. sterilisierten Materialien.

5.2.1.1 Zellkultur der etablierten Zelllinien

Im Folgenden wird der Umgang mit etablierten Zelllinien, vom Auftauen (5.2.1.1.1) über das Passagieren (5.2.1.1.2), die nicht-adhärenzte Kultivierung (5.2.1.1.3), das Kryokonservieren (5.2.1.1.4) bis hin zum Zählen der Zellen (5.2.1.1.5) beschrieben.

5.2.1.1.1 Auftauen von etablierten Zelllinien

Für das Auftauen der Zellen wird das Kryoröhrchen, welches aus dem Stickstofftank entnommen wurde zur Dekontamination mit Methanol abgewischt, für 10 min im 37°C Inkubator aufgetaut und in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml frischem Zellkulturmedium überführt. Um das Einfriermedium, welches das Zellwachstum beeinflussen könnte, herauszuwaschen, werden die Zellen bei 1000 rpm für 5 min pelletiert und in 10 ml frischem Kulturmedium auf einer, für die Zellzahl geeignete Zellkulturschale plattiert.

5.2.1.1.2 Passagieren von etablierten Zelllinien

Ist die gesamte Wachstumsfläche von den Zellen bedeckt, die Zellen also konfluent, müssen sie passagiert werden. Dazu werden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, um sie von Mediumrückständen zu befreien. Anschließend werden 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für eine Schale mit 10 cm Durchmesser hinzugegeben. Durch die Trypsin/EDTA-Lösung wird der Zell-Zell-Adhäsionsapparat enzymatisch verdaut, wodurch sich die Zellen voneinander und vom Boden der Zellkulturschale lösen. Die Dauer der bei 37°C stattfindenden Inkubation hängt vom jeweiligen Zelltyp ab und sollte optisch kontrolliert werden. Durch die Zugabe von serumhaltigen Kulturmedium (i.d.R. 10 % FCS) wird der enzymatische Verdau abgestoppt und die Zellen, je nach ihrem Wachstumsverhalten, im Verhältnis 1:2 bis 1:10 in einer neuen Zellkulturschale ausplattiert.

5.2.1.1.3 Nicht-adhärenente Kultivierung von etablierten Zelllinien

Zusätzlich zur adhärenenten Kultivierung wurde versuchsabhängig auch eine Kultivierung unter nicht-adhärenenten Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden die Zellkulturschalen vor dem Plattieren der Zellen mit 20 mg/ml Poly-HEMA, welches in Ethanol gelöst wurde, beschichtet. Die Menge an Poly-HEMA richtet sich nach dem Durchmesser der Zellkulturschale, wobei der gesamte Plattenboden bedeckt sein sollte. Nachdem sich der Ethanol verflüchtigt hat, ist das Poly-HEMA trocken und die Schale kann mit PBS gewaschen. Anschließend konnten die Zellen wie üblich plattiert werden.

5.2.1.1.4 Kryokonservierung von etablierten Zelllinien

Für die Kryokonservierung von Zellen werden diese zunächst durch Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturschale abgelöst (vgl. 5.2.1.1.2) und durch eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min pelletiert. Das Pellet wird dann im Einfriermedium aufgenommen, resuspendiert und in 1 ml Einfrier Röhrchen überführt. Das Einfriermedium besteht dabei aus dem zellspezifischen Kulturmedium, welches mit 20 % Serum und 7,5 % DMSO versetzt wird, was die Zelle vor Schäden durch die Bildung von Eiskristallen schützt. Die Zellen werden dann schrittweise abgekühlt, indem sie in einer Einfrierbox bei -80°C für zwei bis drei Tage aufbewahrt werden, bevor sie zur Lagerung in den Stickstofftank überführt wurden.

5.2.1.1.5 Zählen von Zellen

Für das Aussäen von definierten Zellzahlen wird zunächst die Gesamtzellzahl einer Zellsuspension nach Ablösen und Vereinzeln der Zellen mit Hilfe des Zellzählers „Cellometer Auto X 400“ unter Berücksichtigung des jeweiligen Zelltyps bestimmt. Unter Umständen muss für das Zählen eine Verdünnung der Zellsuspension erfolgen, die anschließend bei der Berechnung der Zellzahl berücksichtigt werden muss.

5.2.1.2 Zellkultur der OC-Zellen aus Aszites

Für die Etablierung von stabilen Langzeitkulturen primärer Tumorzellen wurden von der AG Reinartz kryokonservierte Tumoreinzelzellen oder Spheroide unterschiedlicher Größe aus Aszites verwendet. Dabei wurden Tumoreinzelzellen oder kleine Tumoraggregate $<30\text{ }\mu\text{m}$ über die MACS-CD45 Depletion aufgereinigt oder Tumorspheroide $>30\text{ }\mu\text{m}$ über Filtration aufgereinigt (Reinartz *et al.* 2016).

Der folgende Abschnitt beschreibt den Umgang mit OC-Zellen, von der Herstellung des OCMI-Mediums (5.2.1.2.1) über das Auftauen der Zellen (5.2.1.2.2), die Kultivierung (5.2.1.2.3), die Bestimmung der Zellzahl (5.2.1.2.4) bis hin zur Kryokonservierung (5.2.1.2.5).

5.2.1.2.1 Zusammensetzung des OCMI-Mediums

Zum Ansetzen des Mediums werden die beiden Medien DMEM/Ham's F12 mit stabilem Glutamin und M199 mit stabilem Glutamin im Verhältnis 1:1 gemischt und mit folgenden Zusätzen supplementiert (Tabelle 5.4.):

Tabelle 5.4. Tabellarische Darstellung der Zusammensetzung des OCMI-Mediums

Supplement	Endkonzentration
FCS	5 %
Insulin	20 µg/ml
EGF	10 ng/ml
Hydrocortison	500 ng/ml
Choleratoxin	25 ng/ml
HEPES	10 mM
Transferrin	10 µg/ml
Triiodothyronin	0,2 pg/ml
O-phosphoryl ethanolamine	5 µg/ml
Selenous acid	8 ng/ml
all- <i>trans</i> retinoic acid	25 ng/ml
Linolsäure	5 µg/ml

Das Medium wird unter sterilen Bedingungen unter der Sterilwerkbank angesetzt und anschließend zusätzlich sterilfiltriert. Nach dem Ansetzen darf das Medium höchstens zwei Wochen verwendet werden und wird bei 4°C gelagert.

5.2.1.2.2 Auftauen der primären Tumorzellen

Das frisch aus dem Stickstofftank entnommene Kryoröhrchen wird zur Mykoplasmen-Dekontamination mit Methanol abgewischt und in der Hand sehr schnell aufgetaut, wobei die Zellen selbst nicht warm werden dürfen. Die aufgetaute Zellsuspension wird in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und sofort 5 ml eiskaltes OCMI-Kulturmedium hinzu pipettiert. Um Rückstände des Einfriermediums zu entfernen, werden die Zellen 10 min bei 300 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in warmem OCMI-Kulturmedium resuspendiert und auf einer der Zellzahl entsprechenden Primaria™-Zellkulturschale plattiert.

5.2.1.2.3 Durchführung der OCMI-Kultur

Für die Kultur der OCMI-Zellen werden sowohl die Medien, als auch das Trypsin auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Alle zwei bis drei Tage findet entweder ein halber Mediumwechsel statt, wobei die Hälfte des Mediums abgesaugt und durch neues ersetzt wird oder die Zellen werden, wenn sie 100 % konfluent sind, passagiert. Für das Passagieren wird das Medium abgenommen, 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und 5-15 min bei 37°C inkubiert, wobei der Zell-Zell-Adhäsionsapparat enzymatisch verdaut wird und sich die Zellen voneinander und vom Boden der Zellkulturschale ablösen. Durch die Zugabe von serumhaltigem Medium (Abstopp-Medium: M199 Medium mit 10 % FCS) wird das Trypsin inaktiviert. Die Zellen werden bei 300 g für 5 min pelletiert und dann auf einer entsprechenden Primaria™-Zellkulturschale in frischem Medium plattiert. Etablierte OCMI-Kulturen bleiben maximal 5 Passagen in Kultur.

5.2.1.2.4 Zellzahlbestimmung

Um für Experimente definierte Zellzahlen aussäen zu können, wird die Gesamtzellzahl einer Zellsuspension nach Ablösen und Vereinzeln bestimmt. Dazu werden 36 µl Trypanblau-Lösung mit 54 µl PBS versetzt und 10 µl Zellsuspension hinzugegeben. Der Ansatz wird gemischt und ein bis zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 10 µl der Zellsuspension-Trypanblau-Mischung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und durch das Auszählen der farblosen, also vitalen Zellen die Zellzahl ermittelt.

$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor (10)}$

5.2.1.2.5 Kryokonservieren von OCMI-Kulturen

Für das Konservieren der primären Tumorzellen, werden diese nach dem Pelletieren in Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO) aufgenommen und 1×10^6 bis 1×10^7 Tumorzellen pro ml Einfriermedium und Kryoröhrchen in die Einfrieröhrchen überführt und in einer Einfrierbox in den -80°C Gefrierschank zum schrittweisen Herunterkühlen gegeben. Zur langfristigen Lagerung werden die Kryoröhrchen nach zwei bis drei Tagen in den Stickstofftank überführt.

5.2.1.3 Mykoplasmentest

Mykoplasmen sind sehr kleine, selbständig vermehrungsfähige Bakterien aus der Klasse der Mollicutes, die parasitär intra- und extrazellulär leben. Deshalb können sie auch in der Kultur von Zelllinien auftreten. Mykoplasmen können die Funktionstüchtigkeit, Stoffwechsel und

Wachstum sowie immunologische und biochemische Eigenschaften der im Labor verwendeten humanen Zellkulturen beeinträchtigen (Rottem & Naot 1998).

Um einen unerwünschten Befall nachweisen zu können, wird in regelmäßigem Abstand von vier Wochen ein Mykoplasmentest durchgeführt und positiv getestete Zelllinien umgehend sachgemäß entsorgt.

Zum Testen des Mykoplasmenbefalls reicht die Verwendung von Zellkulturüberstand aus, da durch abgestorbene Mykoplasmen ausreichend DNA für einen positiven Nachweis im Medium zur Verfügung steht.

Für den Test werden 500 µl Zellkulturüberstand einer möglichst konfluent bewachsenen Zellkulturplatte für 5 min bei 95°C aufgekocht und im Anschluss bei 13.000 rpm 5 min zentrifugiert, um Zellfragmente zu entfernen. 100 µl des Überstandes werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 10 µl Tris/HCl (10 mM, pH 8,8) zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min wird 1 µl des Überstandes in die PCR zur Detektion eines Mykoplasmenbefalls eingesetzt (Primer siehe: 5.1.7) (Van Kuppeveld *et al.* 1992).

5.2.2 Molekularbiologische und Biochemische Methoden

5.2.2.1 Expressionsanalysen

Um die Expression von Genen in einer Zelle unter bestimmten Bedingungen nachzuweisen, wurde zunächst die RNA aus den Zellen isoliert (5.2.2.1.1) und deren Konzentration bestimmt (5.2.2.1.2). Ausgehend von der RNA wurde dann die cDNA synthetisiert (5.2.2.1.3) und die Transkriptmenge eines spezifischen Gens mittels RT-qPCR (5.2.2.1.4) quantifiziert.

5.2.2.1.1 Isolierung von RNA aus Zellkulturen

Die Isolation der RNA aus Zellkulturen erfolgte mit Hilfe des „NUCLEOSPIN RNA II“ Kit (Macherey-Nagel, Düren) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Aufreinigung der RNA mittels Säulenchromatographie. Da beim Arbeiten mit RNA die Gefahr der schnellen Degradation durch RNasen besteht, wurde stets darauf geachtet, die Proben kontaminationsfrei zu halten. Aus diesem Grund wurde auch zur Elution 40 µl RNase freies Wasser verwendet. Nach der Isolation kann die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

5.2.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgt mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 der Firma PqLab (Erlangen). Dafür wurden 1,5 µl der Probe auf den Detektor gegeben und die Konzentration direkt aus der Software (NanoDrop 3.01) abgelesen. Das Prinzip beruht auf der Bestimmung der Absorption des UV-Lichtes von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm und misst dabei die optische Dichte der Probe. Die Absorption erfolgt durch die Mesomerie der heterozyklischen Ringe der Nukleinsäuren, welche Licht aufnehmen können. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz entspricht eine $OD_{260}=1$ bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei RNA 40 µg/ml (Sambrook & W Russell 2001). Des Weiteren wird zur Bestimmung der Reinheit der Probe der Proteinanteil bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, wobei die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan für die Absorption verantwortlich sind. Die Reinheit der Probe wird aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm zu 280 nm ermittelt. Optimalerweise sollte diese 1,8 bis 2,0 betragen, was einer annähernd proteinfreien Lösung entspricht.

5.2.2.1.3 cDNA-Synthese

Nachdem die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert wurde, erfolgt die Umschreibung des Transkriptoms in komplementäre DNA (cDNA). Dies erfolgt mit Hilfe des „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ der Firma BioRad (München). Zum Vergleich unterschiedlicher Proben wurde immer die gleiche Menge an Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese in einem maximalen Gesamtvolumen von 15 µl mit einer Höchstkonzentration von 800 ng eingesetzt; Proben höherer Konzentration wurden mit RNase-freiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt.

Der Reaktionsmix setzt sich wie folgt zusammen:

15 µl RNA (ca. 800 ng)

4 µl 5x iScript reaction mix

1 µl iScript reverse transcriptase

Die reverse Transkription findet für 30 min bei 42 °C statt. Zur Enzyminaktivierung werden die Proben anschließend für 5 min auf 85°C erhitzt. Die cDNA wird vor der Verwendung in der RT-qPCR 1:50 mit 980 µl H₂O verdünnt.

5.2.2.1.4 Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)

Bei der quantitativen Echtzeit PCR wird das zu untersuchende Fragment gleichzeitig amplifiziert und quantifiziert. Diese Methode folgt generell dem Prinzip der PCR (Polymerase-Kettenreaktion), wobei hier die amplifizierten Fragmente in Echtzeit (real time) detektiert werden.

Bei der PCR werden mit Hilfe spezifischer Primer, die komplementär an einen bestimmten Bereich der DNA binden, Abschnitte amplifiziert. Nachdem die Nukleinsäure-Doppelstränge durch einen initialen Denaturierungsschritt voneinander getrennt wurden, sorgen thermostabile DNA-Polymerasen nach der *hot-start*-Aktivierung für die exponentielle Vermehrung des spezifischen DNA-Bereiches in mehreren Zyklen. Diese bestehen aus Denaturierung bei 95°C, sequenzspezifische Anlagerung der Primer („*annealing*“) und dem anschließenden Polymerisationsschritt („*elongation*“ 72°C; 1 min/1 kb). Ein finaler Elongationsschritt für 10 min bei 72°C dient der Vervollständigung der Doppelstränge.

Bei der RT-qPCR erfolgt in Echtzeit die Detektion der gebildeten Amplifikate über die kontinuierliche Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Diese entstehen durch die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green, der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Der daraus entstehende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}}=494$ nm und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 521 nm. Die Fluoreszenzsignale werden nach jedem Amplifikationsschritt gemessen. Aufgrund der Tatsache, dass SYBR Green an die DNA bindet, korreliert die Zunahme der Fluoreszenz mit der Menge an neu synthetisierter DNA. Um die Spezifität des amplifizierten Produktes zu überprüfen, wird am Ende jeden Laufes die Schmelzkurve des Produktes durch die schrittweise Erhöhung der Temperatur von 50°C auf 95°C ermittelt. Dies ist nötig, da die Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes neben den spezifischen Amplifikaten auch unspezifische Amplifikate und Primer-Dimere detektiert. Bei der Denaturierung des PCR-Produktes bei einer sequenzspezifischen Temperatur wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und die Abnahme der Fluoreszenz kann gemessen werden. Erscheint ein „*peak*“, steht dieser für ein spezifisches PCR-Produkt.

Für die RT-qPCR wurde der Fertigmix „Absolute qPCR SYBR Green Mix“ von der Firma Thermo Fisher Scientific (Hamburg) verwendet. Dabei wurden 5 µl des 2-fachen „ABSolute QPCR SYBR Green Mix“ mit 0,25 µl Primermix (10 µM je Primer) versetzt und in die Vertiefungen einer speziellen 96 well-Platte vorgelegt. Dazu wurden 4,75 µl der verdünnten cDNA gegeben. Jede Probe wird dabei in technischen Triplikaten angesetzt. Zur Normalisierung der Werte wurde das Haushaltsgen *RPL27* herangezogen. Die Messung fand mit dem „Mx300P qPCR System“ (Stratagene, Niederlande) und der dazugehörigen Computersoftware statt.

Standardmäßig wurde folgendes PCR-Programm benutzt:

Initiale Denaturierung und Aktivierung der hot-start- Polymerase	15 min 95 °C	
Denaturierung	15 Sek 95°C	} 40 Zyklen
Annealing	20 Sek 60°C	
Elongation	15 Sek 72°C	

5.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Die Konzentration von Proteinextrakten wurde nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Dabei macht man sich zunutze, dass die Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G-250 an Proteine eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm zur Folge hat. Diese äußert sich in einem sichtbaren Farbumschlag und wird als Maß für die Gesamtproteinkonzentration in der Lösung genutzt. Durchgeführt wurde die Messung mit dem kommerziell verfügbaren „Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ (BioRad, München). Zur Quantifizierung des Proteingehaltes dient eine Standardreihe, die aus verschiedenen Verdünnungen an BSA im Bereich von 0,025 µg/µl bis 2,5 µg/µl hergestellt wurde. Die Messung der Absorption erfolgte in Triplikaten und wurde bei 595 nm mit dem „ELISA-Reader SPECTRA MAX340“ (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Aus den im Photometer gemessenen Extinktionswerten wurde eine Eichkurve erstellt und die Steigung der Ausgleichsgeraden ermittelt. Anhand dieser Steigung konnte der Proteingehalt der Zelllysate berechnet werden.

5.2.3 Metabolische Analysen

5.2.3.1 Metabolische Analysen mittels Seahorse XFe Analysers

5.2.3.1.1 Das Messprinzip des Seahorse XFe96 Flux Analyzers

Der Seahorse XFe96 Analyzer ist eine nicht invasive Methode zur simultanen Messung der zwei Hauptenergiegewinnungswege der Zelle, der mitochondrialen Atmung und der Glykolyse in Echtzeit (Abbildung 5.1.). Diese Bestimmung erfolgt über die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate; OCR) und der extrazellulären Azidifizierungsrate (extracellular acidification Rate; ECAR). Diese entspricht der Protonenbildung und deren Ausschleusung im Symport mit Laktat oder anderen Monocarbonsäuren in das Medium der Zellen. Das Messprinzip beruht auf analytspezifischen Fluorophoren, deren Fluoreszenzsignal durch die Anwesenheit des entsprechenden Analyts verringert wird. Nimmt das Fluoreszenzsignal des Analyts O₂ ab, so lässt dies Rückschlüsse auf

das Ausmaß der Reduktion von O_2 zu H_2O im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung zu. Die Ausschleusung von Laktat (oder auch Pyruvat) aus der Zelle stellt die Hauptquelle von freien Protonen im Medium da, somit ist der Anstieg des H^+ -Gehalts im Medium ein Indikator für die glykolytische Aktivität der Zellen.

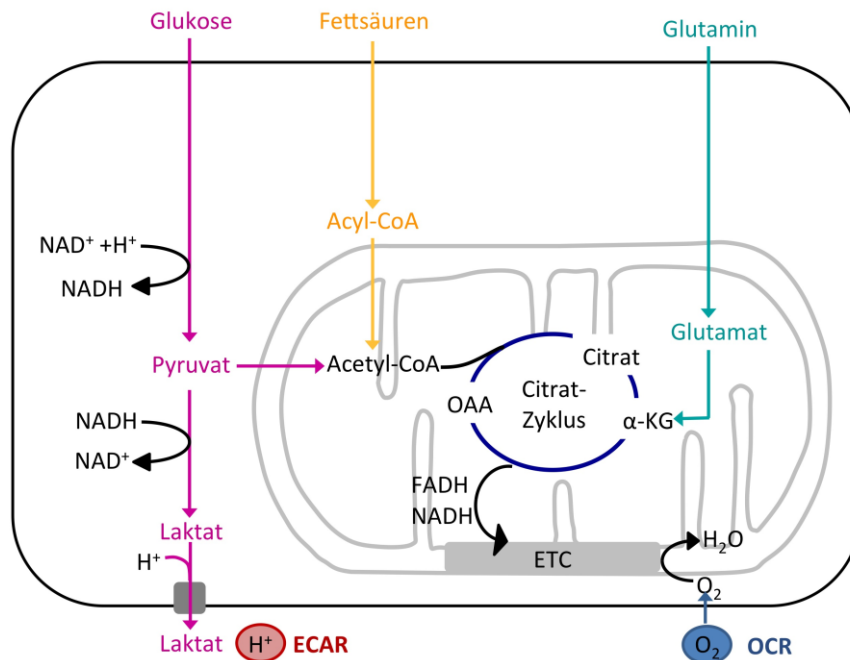


Abbildung 5.1. Übersichtsabbildung über die Hauptenergiegewinnungswege der Zelle: die mitochondriale Respiration und die Glykolyse.

Wenn Sauerstoff verfügbar ist, können die Zellen ATP unter Sauerstoffverbrauch und unter Verwendung verschiedener Substrate wie Glukose, Fettsäuren und Glutamin generieren. Da hierbei der im Medium vorhandene Sauerstoff verbraucht wird, wird dieser Vorgang OCR (Oxygen consumption rate) genannt. Zellen sind außerdem in der Lage ATP über die aerobe Glykolyse zu gewinnen, unabhängig von Sauerstoff, wobei Laktat entsteht. Der Laktat/ H^+ -Symport stellt die Hauptquelle von Protonen im Medium dar, welche dieses ansäuern, weshalb dieser Vorgang als extrazelluläre Azidifizierung (ECAR) bezeichnet wird.

Der Versuchsaufbau basiert auf einer für das Gerät speziellen 96 well Zellkulturplatte, sowie der XFe-Sensorenplatte. Die Sensorenplatte ist mit zwei analytspezifischen (O_2 und pH), fluoreszierenden Biosensoren bestückt, deren Fluoreszenzsignale durch ein optisches Fiberglas-Lichtwellenleitersystem an einen Photodetektor weitergeleitet und computergestützt ausgewertet werden. Zu Beginn jeder Messung wird die Sensorenplatte heruntergefahren, um ein extrem kleines Reaktionskompartiment von weniger als $3\ \mu l$ Mediumvolumen oberhalb der, als Monolayer wachsender, Zellen zu isolieren (Abbildung 5.2.).

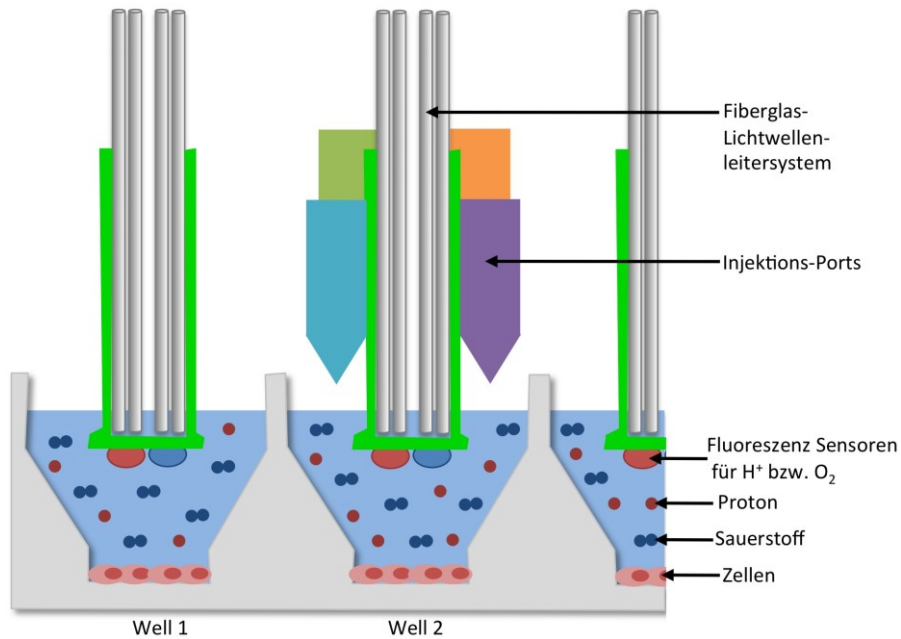


Abbildung 5.2. Schematische Darstellung des Messprinzips des Seahorse Extracellular Flux Analyzers XFe96.

Dargestellt ist die Sensorenplatte (grün), die über die Zellkulturplatte (grau) positioniert ist. Die Zellen befinden sich am Boden jeden wells als Monolayer, darüber das Medium mit den darin gelösten Analyten O_2 und H^+ . Diese werden durch analytspezifische Fluoreszenzsensoren detektiert und als Lichtsignal über das Fiberglas-Lichtwellenleitzersystem zur Analyseeinheit weitergeleitet, wo die computergestützte Auswertung stattfindet. Außerdem enthält jedes well vier Injektionsports, durch die benutzerdefiniert Substanzen während der Messung hinzugefügt werden können. (Modifiziert nach Seahorse Bioscience)

Innerhalb dieser Mikrokammer können Konzentrationsänderungen von gelöstem Sauerstoff und freien Protonen im Sekundentakt bestimmt werden. In jedem well detektieren zwei unabhängige Fluorophore den Sauerstoffpartialdruck und den pH-Wert im Medium direkt über den Zellen. Anschließend wird aus den Messpunkten für die OCR die Steigung aus der Kurve aus O_2 -Partialdruck (mmHg) gegen die Zeit (min) aufgetragen und somit der O_2 -Verbrauch in pmol/min berechnet. Ebenso ergibt sich die ECAR aus der Steigung der pH-Kurve gegen die Zeit und wird in mpH/min angegeben (Abbildung 5.3.).

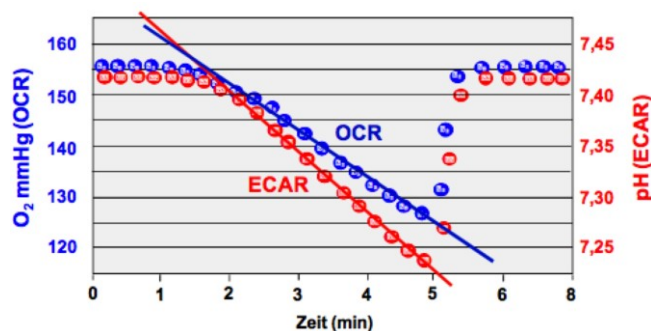


Abbildung 5.3. Berechnung von OCR und ECAR mit dem Seahorse Analyzer XFe96.

Dargestellt ist die Messung der OCR und ECAR zu einem Messpunkt. Dabei wird die OCR in pmol/min aus der Steigung des O_2 -Partialdrucks aufgetragen gegen die Zeit in min (blauer Graph) berechnet. Die ECAR wird aus der Steigung der roten Kurve, also des pH-Wertes aufgetragen gegen die Zeit bestimmt und erhält damit die Einheit mpH/min. (Seahorse Bioscience)

Im Anschluss an eine Messung wird die Sensorenplatte auf und ab bewegt, um das Medium der Reaktionskammer mit dem gesamten Medium zu mischen, wodurch die Ausgangssituation wiederhergestellt wird.

Zusätzlich können vier unterschiedliche Substanzen pro *well* an definierten Zeitpunkten während der Messung mit Hilfe der Injektions-Ports hinzugegeben werden (Abbildung 5.2.).

5.2.3.1.2 Simultane Messungen von H^+ und O_2

Zur Messung der Zelllinien wurde einen Tag vor der Messung die für jede Zelllinie definierte Zellzahl in 80 μ l des Kulturmediums plattiert. Die Platten wurden zuvor für die bessere Haftung der Zellen mit Gelatine beschichtet, indem in jedes *well* 100 μ l Gelatine (1 % in H_2O) gegeben und nach einminütiger Inkubation wieder entfernt wurde. Um Randeffekte aufgrund einer ungleichmäßigen Erwärmung der Kulturplatte zu vermeiden, verbleiben die plattierten Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur, wo sie wärmeunabhängig, gleichmäßig sedimentieren. Anschließend werden die Zellen bis zum Start der Messung in den Inkubator bei 37°C und 5 % CO_2 gestellt. Die Sensorenplatte wurde ebenfalls einen Tag vor Versuchsbeginn mit 200 μ l XFe Calibrant Solution je *well* hydriert und bei 37°C ohne CO_2 -Begasung inkubiert.

Eine Stunde vor Versuchsbeginn erfolgt der Austausch des Kulturmediums gegen das Messmedium, wobei die Zellen zunächst zweimal mit 200 μ l des auf 37°C erwärmten Messmediums gewaschen werden und anschließend das benötigte Mediumvolumen in die *wells* gegeben wird. Anschließend wird die Zellkulturplatte bis zum Messvorgang bei 37°C für eine Stunde ohne CO_2 -Begasung inkubiert.

Da es bei der Anheftung der primären Tumorzellen auf der XFe96 *well* Zellkulturplatte Probleme gab, wurde hier auf das Anzentrifugieren der Zellen zurückgegriffen, was direkt vor der Messung stattfindet. Dabei werden die Zellen bereits im benötigten Volumen des Messmediums plattiert und anschließend in der Zentrifuge bis zu 50 g anzentrifugiert (Acc/Dec 5). Anschließend wird die Platte um 180° gedreht und bei einer Beschleunigung und Bremsgeschwindigkeit von 5 erneut bis 300 g anzentrifugiert (Multifuge 3L-R, Heraeus Hanau). Auch in diesem Fall wird die Zellkulturplatte bis zum Beginn der Messung bei 37°C für eine Stunde ohne CO_2 -Begasung inkubiert. Dies ist wichtig, um Störungen der Messung des pH-Wertes, aufgrund der Pufferkapazität von CO_2 , zu vermeiden.

In der Zwischenzeit erfolgt die Beladung der Injektionsports. Hierbei werden die zu injizierenden Substanzen für Port A, B, C bzw. D in 8-, 9-, 10- bzw. 11-facher Endkonzentration angesetzt, sodass sich nach der Injektion von 25 μ l zu einer anfänglichen Mediummenge von 175 μ l die gewünschte Endkonzentration ergibt.

Nach der Beladung der Injektionsports wird zunächst die Sensorenplatte in den XFe-Analyzer transferiert, woraufhin dieser selbstständig eine Kalibrierung der Sensoren durchführt, um deren Funktion zu gewährleisten. Nun kann die Zellplatte in das Gerät transferiert werden. Im Anschluss daran findet zunächst eine zehnminütige Äquilibrierungsphase statt, die der Reduktion von Temperaturschwankungen innerhalb des Systems dient.

Nun wird die Sensoren- und Zellkulturplatte zusammengesetzt und mit den Messzyklen begonnen. Jeder Messzyklus besteht aus einem Mischvorgang von drei Minuten und einem Messvorgang von weiteren drei Minuten. Die Messvorgänge werden entsprechend der Benutzer-spezifischen Fragestellung durchgeführt. Nach typischerweise drei basalen Messvorgängen kann mit der Injektion von Substanzen begonnen werden, die zur Charakterisierung des metabolischen Phänotyps eingesetzt werden.

5.2.3.1.3 Etablierung von Seahorse-Messungen einer neuen Zelllinie

5.2.3.1.3.1 Zellzahl- und Oligomycin-Titration

Um eine optimale Messung garantieren zu können, ist es entscheidend die Zellzahl jeder Zelllinie vor Beginn der eigentlichen Messung zu etablieren. Dazu werden die Reihen der XFe 96 *well* Zellplatte in steigender Zellzahl von 10.000 bis 80.000 Zellen pro *well* bestückt und die Messung wie beschrieben durchgeführt. Bei der Auswahl einer geeigneten Zellzahl sollten folgende Aspekte beachtet werden: Die Zellen sollten in einem einheitlichen Monolayer wachsen und gerade so dicht sein, dass sich die Zellen beim Waschen vor Versuchsbeginn nicht ablösen. Des Weiteren sollte die basale OCR zwischen 50 und 150 pmol/min liegen, um inhibitorische oder aktivierende Effekte durch die Injektion von Substanzen gut sehen zu können. Außerdem sollte die Streuung der Einzelmessungen gering sein.

Zusätzlich zur Zellzahl kann in dieser Messung auch die Oligomycin-Konzentration titriert werden. Oligomycin bindet an den Protonenkanal der ATP-Synthase der Atmungskette und inhibiert diese. Dadurch kann Sauerstoff nicht mehr zu Wasser reduziert werden, wodurch der Sauerstoffverbrauch gestoppt ist.

Für die Titration erhöht man die Oligomycin-Konzentration bei jeder Injektion um 0,5 µM und wählt dann eine Konzentration aus, bei der die Hemmung der OCR maximal ist.

5.2.3.1.3.2 FCCP-Titration

Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) ist ein Ionophor und zerstört die ATP-Syntese der Atmungskette, weil die Protonen durch die Ionophore ins Innere der Mitochondrienmembran gelangen können, bevor der Protonengradient für die oxidative Phosphorylierung genutzt werden kann.

Aufgrund eines sehr engen Konzentrationsoptimums muss die FCCP-Konzentration für jede Zelllinie sehr genau bestimmt werden. Dabei wird zu der jeweils etablierten Zellzahl während der Messung durch die Injektion über die Injektionsports die FCCP-Konzentration stufenweise erhöht. Zu einem Viertel der Zellen werden je Injektion 0,025 µM FCCP hinzugegeben, sodass nach Injektion zwei eine Konzentration von 0,05 µM, nach Injektion drei eine Konzentration von 0,075 µM und nach Injektion vier eine Konzentration von 0,1 µM erreicht ist. Ebenso wird für die drei weiteren Viertel verfahren, bei denen je Injektion 0,25 µM, 0,8 µM bzw. 2,5 µM injiziert werden.

Für weiterführende Seahorse-Messungen wurden folgende etablierte Zellzahlen und Konzentrationen verwendet (Tabelle 5.5.).

Tabelle 5.5. Darstellung der etablierten Zellzahlen, Oligomycin- und FCCP-Konzentrationen für Messungen mit dem Seahorse-XFe-Analyzer

Zelllinie	Zellzahl	Oligomycin-Konzentration	FCCP-Konzentration
SKOV-3	40.000	2 µM	0,25 µM
OVCAR-3	40.000	2 µM	0,1 µM
IGROV-1	30.000	2 µM	0,25 µM
HEY	30.000	2 µM	0,05 µM
A549	40.000	2 µM	1,6 µM
HeLa	40.000	2 µM	0,5 µM
MCF-7	30.000	2 µM	0,25 µM
MCF-10A	40.000	2 µM	0,5 µM
OC_38	15.000	2 µM	0,25 µM
OC_91 <30 µm	40.000	2 µM	0,25 µM
OC_91 >30 µm	40.000	2 µM	0,25 µM
OC_92	40.000	2 µM	0,5 µM
OC_108	20.000	2 µM	0,5 µM
OC_119	30.000	2 µM	0,5 µM
OC_122	30.000	2 µM	0,25 µM
OC128	40.000	2 µM	0,5 µM

5.2.3.1.4 Bestimmung der mitochondrialen Respiration von Zellen

Ein standardmäßig verwendeter Test zur Charakterisierung des zellspezifischen Metabolismus ist die Bestimmung der mitochondrialen Respiration. Diese hat eine große Bedeutung in zellulären Schlüsselfunktionen. Verschiedene fundamentale Parameter der mitochondrialen Funktion können mit dem „Mito Stress Test Kit“ (Agilent Technologies, Santa Clara (USA)) bestimmt werden: die basale Respiration, die ATP-gekoppelte Respiration, maximale Respiration und die nicht-mitochondriale Respiration. Das Protonen-Leck und die respiratorische Reserve können außerdem aus der basalen Respiration und der Verwendung der weiteren Parameter berechnet werden (Abbildung 5.4.).

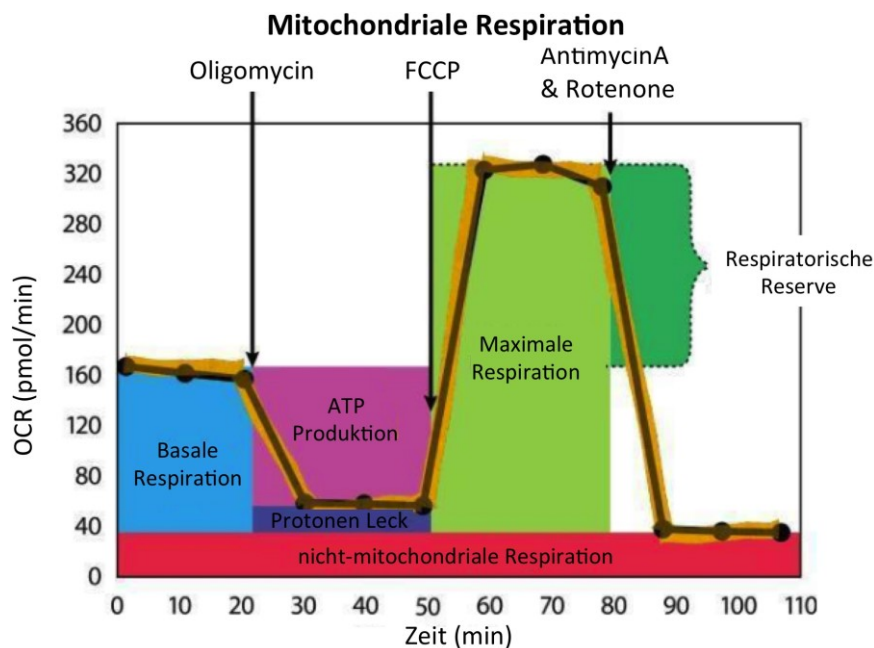


Abbildung 5.4. Übersichtsabbildung über die verschiedenen Parameter der mitochondrialen Respiration.

Die detaillierte Beschreibung ist im Text nachzulesen. (Modifiziert nach Seahorse Bioscience)

Die Bestimmung dieser Parameter erfolgt mit Hilfe von Substanzen, die spezifisch auf Bestandteile der Elektronen-Transportkette (ETC) wirken. Dabei werden die Substanzen Oligomycin, FCCP und ein Mix aus AntimycinA und Rotenone nacheinander zu den Zellen gegeben und dabei die OCR bestimmt.

Die basale Respiration beschreibt dabei den Energiebedarf einer Zelle unter normalen Bedingungen.

Die Injektion von Oligomycin gibt an, wie viel Sauerstoff zur ATP-Produktion genutzt wird. Oligomycin inhibiert die ATP-Synthase der Atmungskette, indem es ihren Protonenkanal, der für die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP notwendig ist, blockiert.

Der Anteil der basalen Respiration, der nicht zur Synthese von ATP genutzt wird, wird als Protonen-Leck bezeichnet und kann als Maß für die Integrität der Elektronen-Transportkette genutzt werden.

Die Injektion von FCCP führt zur maximalen Respiration. FCCP ist ein Protonophor, also ein mobiler H^+ -Beförderer durch die innere mitochondriale Membran, der das mitochondriale Membranpotential abbaut und damit die Verknüpfung von Oxidation und Phosphorylierung unterbricht. Damit kann die ATP-Synthese nicht mehr erfolgen. Dadurch, dass die Protonen nicht mehr gegen den elektrochemischen Gradienten transloziert werden müssen, laufen die Oxidationsschritte in den Komplexen I bis IV viel schneller ab. Dies führt zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und damit zur maximalen Respiration, weil die Regulation der Atmungskette über die ADP-Konzentration nicht mehr wirksam ist.

Als respiratorische Reserve wird dann die Differenz zwischen der basalen und der maximalen unkontrollierten Respiration bezeichnet. Diese ist ein Maß dafür, wie gut die Zellen auf einen gesteigerten Energiebedarf reagieren können. Außerdem kann daran bemessen werden, wie nah die Zelle an ihrem theoretischen respiratorischen Maximum ist.

Die nicht-mitochondriale Respiration wird durch die Injektion von einem Mix aus AntimycinA und Rotenone bestimmt und basiert auf dem Sauerstoffverbrauch einiger zellulärer Enzyme.

Ein typischer Mito-Stress-Test wird in *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin und 20 mM Glukose durchgeführt. Dafür werden die Zellen am Vortag des Assays in der etablierten Zellzahl im jeweiligen Kulturmedium ausgesät (Zelllinien) und dann am Tag des Assay in 175 μ l des Assaymediums überführt oder die Methode des anzentrifugierens gewählt (OC-Zellen) (beschrieben in 5.2.3.1.2.).

Typischerweise erfolgen zunächst drei basale Messpunkte, bevor die Substanzen injiziert werden (5.2.3.1.2). Jeder Messpunkt besteht aus 3 min mixen und 3 min messen.

5.2.3.1.5 Bestimmung der glykolytischen Funktion von Zellen

Die Messung der Laktatproduktion (ECAR) in Echtzeit, während der Erzeugung von akutem metabolischen Stress mit Hilfe des „Glyco-Stress-Test Kits“ (Agilent technologies, Santa Clara (USA)), erlaubt die Messung der Glukosenutzung unter verschiedenen Bedingungen und die Bestimmung der Parameter: glykolytische Kapazität, glykolytische Reserve und nicht-glykolytische Azidifizierung (Abbildung 5.5.).

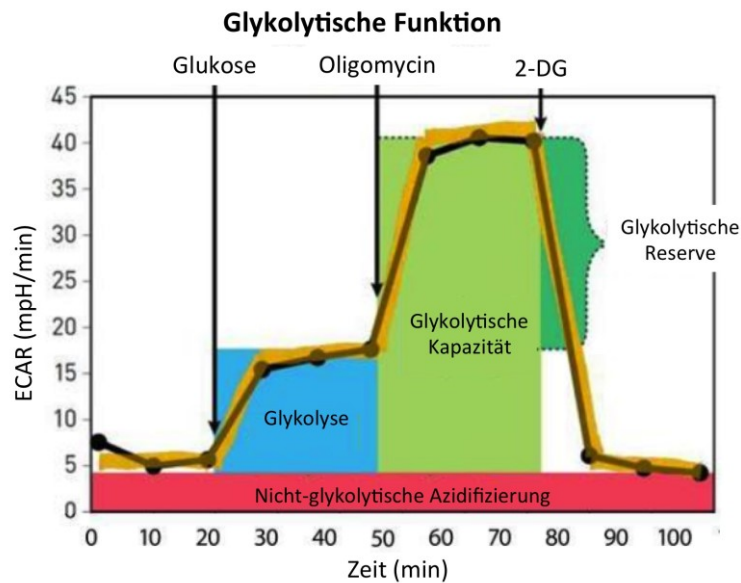


Abbildung 5.5. Übersichtsabbildung über die verschiedenen Parameter der glykolytischen Funktion.
Die detaillierte Beschreibung ist im Text nachzulesen. (Modifiziert nach Seahorse Bioscience)

Bei der Messung werden nacheinander die Substanzen Glukose, Oligomycin und 2-Deoxyglukose zu den Zellen gegeben und die ECAR bestimmt. Durch die Zugabe von Glukose zu den Zellen kann die Rate der Glykolyse bestimmt werden. Die glykolytische Kapazität wird durch die Injektion von Oligomycin erreicht. Oligomycin verhindert die ATP-Bildung durch OXPHOS, wodurch die Zelle zur gesteigerten ATP-Generierung mittels Substratketten-Phosphorylierung gezwungen wird, um ihren Energiestatus aufrecht zu erhalten. Dadurch werden außerdem die Zellen zur maximalen Laktatproduktion gebracht, um die Glykolyse durch das Recyceln von NADH zu NAD⁺ am Laufen zu halten.

Die glykolytische Reserve ergibt sich aus der Differenz zwischen der Glykolyse und ihrem theoretischen Maximum, der glykolytischen Kapazität, und ist ein Maß dafür, wie gut die Zellen auf einen gesteigerten Energiebedarf reagieren können. Die nicht-glykolytische Azidifizierung misst die extrazelluläre Azidifizierung, die nicht auf die Glykolyse zurückzuführen ist. Diese ergibt sich aus der gemessenen ECAR nach Injektion von 2-DG. 2-DG ist ein Glukosemolekül mit Wasserstoff anstelle der 2-Hydroxyl-Gruppe und agiert als Kompetitor zur Glukose (Abbildung 5.6.). Während Glucose von der Hexokinase zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert wird, wird 2-DG zu 2-Deoxyglucose-6-Phosphat, welches durch die Phosphoglucose-Isomerase nicht weiter metabolisiert werden kann.

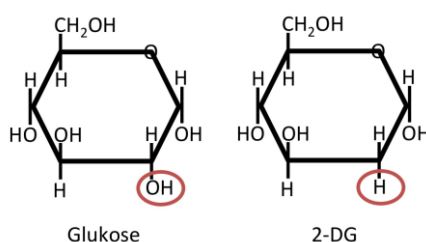


Abbildung 5.6. Vergleichende Darstellung zwischen Glukose und 2-Deoxyglukose (2-DG).

2-DG unterscheidet sich von Glukose durch den Austausch der 2-Hydroxyl-Gruppe, welche im 2-DG-Molekül durch Wasserstoff ersetzt wird.

Ein typischer „Glyco-Stress-Test“ wird in low-buffered DMEM ohne Glukose oder Pyruvat durchgeführt, um durch die Injektion von Glukose die Glykolyserate messen zu können.

Der genaue Ablauf der Messung ist in 5.2.3.1.2 beschrieben. Für die Zugabe von Glukose wird eine nicht limitierende Konzentration von 10 mM gewählt, 2-DG wird in einer 10-fach höheren Konzentration (100 mM) eingesetzt.

5.2.3.2 Enzymaktivitätsmessungen

5.2.3.2.1 Zelllyse für Enzymaktivitätsmessungen

Für die Zelllyse werden zunächst die Zellen von drei bis vier Schalen mit 10 cm Durchmesser mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und die Trypsinwirkung mit Medium abgestoppt. Anschließend werden die Zellen für 5 min bei 1000 g pelletiert und in 5 ml PBS aufgenommen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration dieser Zellsuspension wurden 10 µl davon mit 20 µl FLAG-Lysepuffer für 5 min bei Raumtemperatur lysiert und anschließend mit 270 µl H₂O verdünnt. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min werden die Zelltrümmer entfernt. 20 µl des Überstandes werden dann mit 200 µl Bradford-Reagenz (Bio Rad Protein Assay) in einer Mikrotiterplatte gemischt und die OD₅₉₅ bestimmt (5.2.2.2.).

Die restliche Zellsuspension wird in der Zwischenzeit bei 1000 g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in Digi-Buffer resuspendiert. Die Endkonzentration der Proben wird mit Digi-Puffer auf 2 mg/ml eingestellt und die Proben für nicht länger als 15 min auf Eis inkubiert. Die Trennung einer mitochondrialen Fraktion von der cytoplasmatischen Fraktion basiert auf der Publikation von Drapier & Hibbs (1996). Digitonin ist ein nichtionisches Tensid, welches die Zellmembran permeabilisiert und lysiert, sodass man durch die anschließende Zentrifugation bei 13.400 rpm und 4°C für 10 min eine cytosolische Fraktion im Überstand und die Membranfraktion, die neben der Kerne auch die Mitochondrien enthält, im Sediment erhält. Der Überstand, der nicht mehr benötigt wird, kann anschließend verworfen werden. Das Pellet wird in 1 ml Mito-Buffer zum Waschen aufgenommen und nach einer erneuten Zentrifugation von 10 min bei 13.400 rpm und 4°C wird das Pellet in der Ausgangsmenge Mito-Buffer aufgenommen. Zur exakten Proteinkonzentrationsbestimmung werden 10 µl jeder Probe entnommen, diese wieder mit 20 µl Flag-Lysepuffer für 5 min lysiert, mit 270 µl H₂O verdünnt. Nach der Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min werden 20 µl des Überstandes mit 200 µl Bradford-Reagenz in einer Mikrotiterplatte gemischt und die OD₅₉₅ bestimmt.

Für die Enzymaktivitätsmessungen werden die Lysate auf die gleiche Gesamtproteinmenge von 0,85 µg/µl mit Digi-Puffer eingestellt. Die Lysate können an dieser Stelle zur späteren Analyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

5.2.3.2.2 Auswertung der Enzymaktivitätsmessung

Bei der Auswertung wird zunächst die unspezifische Aktivität, also der Referenzwert vom jeweiligen Messwert abgezogen. Von den Messwerten wird im linearen Bereich der Messung die Steigung bestimmt. Anschließend wird mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes die absolute Aktivität bestimmt (Abbildung 5.7.).

$$\frac{\Delta OD}{\Delta t} = \frac{\Delta c}{\Delta t} \times \epsilon \times d$$

$$[mU] \quad \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\frac{\Delta OD}{\Delta t}}{\epsilon \times d}$$

$$\frac{U}{mg} = \frac{mU}{mg \text{ Protein} \times 1000}$$

Abbildung 5.7. Lambert-Beersches Gesetz zur Berechnung der absoluten Aktivität der Enzyme.

Der obere Teil stellt die Ausgangsformel dar, der mittlere ist nach den zu berechnenden Parametern umgestellt. $\Delta OD/\Delta t$ = errechnete Steigung, ϵ = Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers, $\Delta c/\Delta t$ = die in einer bestimmten Zeit umgesetzte Stoffmenge. Die Einheit der spezifischen Enzymaktivität [U/mg] errechnet sich aus der absoluten Enzymaktivität pro Proteinmenge (unten).

Dabei ist $\Delta OD/\Delta t$ die errechnete Steigung, ϵ der Extinktionskoeffizient, d die Schichtdicke des durchstrahlten Körpers und $\Delta c/\Delta t$ die in einer bestimmten Zeit umgesetzte Stoffmenge in mU. Aus der absoluten Aktivität pro Proteinmenge wird schließlich die spezifische Aktivität berechnet und hat die Einheit U/mg.

5.2.3.2.3 Messung der Aconitase-Aktivität

Die Messung der Aconitase-Aktivität findet als gekoppelte Reaktion statt, da man die Bildung von Isocitrat nicht nachweisen kann. Von jeder Probe werden 5, 10 und 15 µl in Duplikaten in einer UV-Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wird der Reaktionsmix für die Proben und die Referenzwerte wie folgt angesetzt:

Reagenz	Probe	Referenz
Aconitase-Assay Puffer	235 µl	235 µl
NADP ⁺ (100 mM)	12,5 µl/ml	12,5 µl/ml
cis-Aconitat (20 mM)	15 µl/ml	--
IDH (40 mU/µl)	5 µl/ml	--

Der jeweilige Reaktionsmix wird dann zu den vorgelegten Proben gegeben und die Messung ungefähr alle 17 sek über einen Zeitraum von ca. 60 min bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ nm}$ unverzüglich durchgeführt, um einen kinetischen Verlauf der Aktivität zu erhalten. Bei der Reaktion wird cis-Aconitat durch die Aktivität der im Lysats enthaltenen Aconitase zu Isocitrat umgesetzt und dieses dann durch die im Reaktionsansatz hinzugegebene, rekombinante IDH zu α -Ketoglutarat umgesetzt. Dabei wird NADP^+ zu NADPH reduziert (Abbildung 5.8.). Bei dieser Messung macht man sich zu Nutze, dass NADPH als reduzierte Form, im Gegensatz zur oxidierten Form (NADP^+) in der Lage ist, Licht bei der Wellenlänge von 340 nm zu absorbieren. Während der Messung wird deshalb die Menge an gebildetem NADPH gemessen, welches indirekt Auskunft über die Aktivität der ACO gibt, da diese das Isocitrat bildet, was in dieser Reaktion der limitierende Faktor ist. Der Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Rose & O'Connell 1967; Drapier & Hibbs 1996; Hausladen & Fridovich 1996). Die Berechnung der Aktivität erfolgt wie in 5.2.3.2.2 beschrieben.

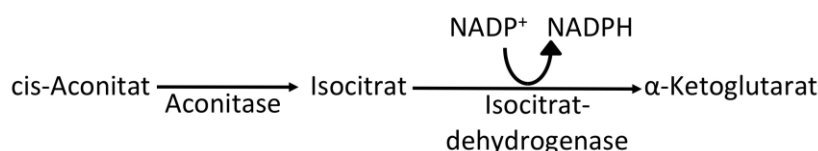


Abbildung 5.8. Schematische Darstellung des Messprinzips der Aconitase-Aktivität.

cis-Aconitat wird durch die im Proteinlysats enthaltene Aconitase zu Isocitrat umgesetzt. Durch die darauffolgende IDH-Reaktion kann die Aconitase-Aktivität visualisiert werden, da das durch die Umsetzung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat entstehende NADPH im Photometer gemessen werden kann.

5.2.3.2.4 Messung der Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase (NAD^+ bzw. NADP^+ abhängig)

Bei der IDH-Aktivitätsmessung kann man durch den spezifischen Einsatz von NAD^+ oder NADP^+ zwischen der NAD -abhängigen (IDH3) und der NADP -abhängigen (IDH2) Isocitrat-Dehydrogenase unterscheiden. Auch hier werden 5, 10, 15 und 20 μl des Lysats in Duplikaten in einer UV-Mikrotiterplatte vorgelegt und der entsprechende Reaktionsmix für die Proben und die Referenzen hinzugegeben.

Reagenz	Probe	Referenz
Isocitrat-Dehydrogenase-Assay Puffer	235 μl	235 μl
NADP^+ oder NAD^+ (100 mM)	12,5 $\mu\text{l/ml}$	12,5 $\mu\text{l/ml}$
Isocitrat (100 mM)	12,5 $\mu\text{l/ml}$	--

Die Messung der Isocitrat-Dehydrogenase Aktivität entspricht der zweiten Reaktion der Aconitase-Aktivitätsmessung (5.2.3.2.3.). Hierbei wird durch die im Lysat enthaltene IDH Isocitrat zu α -Ketoglutarat umgesetzt, einhergehend mit der Bildung von NADH bzw. NADPH

(Abbildung 5.9.). Die reduzierte Form (NADH oder NADPH) kann, im Gegensatz zur oxidierten Form (NAD⁺ oder NADP⁺), Licht bei der Wellenlänge von 340 nm absorbieren. Die Bildung von NADH bzw. NADPH wird über einen Zeitraum von 60 min etwa alle 20 sek bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ nm}$ detektiert. Der Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Berechnung der Aktivität erfolgt wie in 5.2.3.2.2 beschrieben.

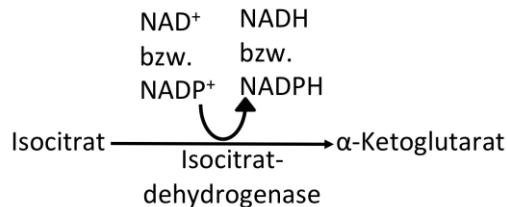


Abbildung 5.9. Schematische Darstellung des Messprinzips der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität.

Isocitrat wird durch die im Proteinlysate vorhandene IDH zu α-Ketoglutarat umgesetzt, wobei enzymabhängig entweder aus NAD⁺ NADH oder aus NADP⁺ NADPH entsteht. Die Bildung von NADH und NADPH kann während der Messung im Photometer visualisiert werden.

5.2.3.2.5 Messung der Citrat-Synthase Aktivität

Die Citrat-Synthase-Aktivität lässt sich ebenfalls spektrophotometrisch bestimmen. Die Bildung von Citrat aus Oxalacetat und Acetyl-CoA führt zur Abspaltung von Coenzym-A, das dann mit 5,5'-Dithio-bis-[2-Nitrobenzoesäure] (DTNB) einen gelben Farbstoff formt (Srere *et al.* 1963) (Abbildung 5.10)

Für die Messung der Aktivität werden die Proteinlysate zunächst 1:10 vorverdünnt und dann je Probe 5-, 10-, 15- und 20 µl in Duplikaten in eine 96 well Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend der entsprechende Reaktionsmix für die Proben und die Referenzwerte hinzugegeben.

Reagenz	Probe	Referenz
Citrat-Synthase Assay Puffer	240 µl	240 µl
Acetyl-CoA (10 mg/ml)	12,5 µl/ml	12,5 µl/ml
Oxalacetat (10 mg/ml)	20 µl/ml	--

Bei der Messung der Referenz Proben wird nur eines der beiden Substrate hinzugegeben, um den Hintergrund zu bestimmen. Die Messung erfolgt über einen Zeitraum von 30 min etwa alle 30 sek bei einer Wellenlänge von $\lambda = 412 \text{ nm}$. Der Extinktionskoeffizient beträgt hierbei $\epsilon = 13,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Berechnung der Aktivität erfolgt wie in 5.2.3.2.2 beschrieben.

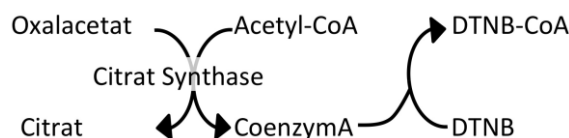


Abbildung 5.10. Schematische Darstellung des Messprinzips der Citrat-Synthase-Aktivität

Die Bildung von Citrat aus Oxalacetat und Acetyl-CoA führt zu Abspaltung von Coenzym-A. Dieses formt dann mit 5,5'-Dithio-bis-[2-Nitrobenzoesäure] (DTNB) einen gelben Farbstoff, der im Photometer detektiert werden kann.

5.2.3.2.6 Laktat-Dehydrogenase-Enzymaktivitäts-Assay

Die Messung der Laktat-Dehydrogenase Aktivität wird genutzt, um die Effizienz der Trennung der Membranfraktion von der Cytoplasmafraktion zu bestimmen. Die Laktat-Dehydrogenase befindet sich nicht im Mitochondrium, sondern im Cytoplasma und kann deshalb genutzt werden, um zu überprüfen, wie viele Cytoplasma-Bestandteile noch in der Membranfraktion vorhanden sind.

Vor Beginn der Messung werden die Proben aufgrund der hohen LDH-Aktivität 1:10 vorverdünnt. Auch findet der Assay aus diesem Grund im 48 *well* Format statt. Darin werden 5-, 10-, bzw. 15 μl des verdünnten Proteinlysats vorgelegt und der entsprechende Reaktionsmix dazugegeben. Als Referenzprobe dienen *wells* ohne Lysat.

Reagenz	Probe	Referenz
Laktat-Dehydrogenase-Assay-Puffer	740 μl	740 μl
Na-Pyruvat (50 mM)	15 $\mu\text{l/ml}$	15 $\mu\text{l/ml}$
NADH (10 mg/ml)	15 $\mu\text{l/ml}$	15 $\mu\text{l/ml}$
Zelllysats	0,425, 0,85 bzw. 1,275 μg	--

In dieser Reaktion wird durch die LDH das Na-Pyruvat zu Laktat umgesetzt, wobei NADH zu NAD^+ oxidiert wird (Abbildung 5.11.). Da nur NADH in der Lage ist, Licht bei einer Wellenlänge 340nm zu absorbieren, ist in diesem Ansatz eine Abnahme des Signals zu messen. Die Messung findet über einen Zeitraum von 30 min alle 14 sek bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ nm}$ statt und der Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Die Berechnung der Aktivität erfolgt wie in 5.2.3.2.2 beschrieben.

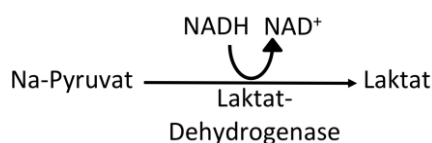


Abbildung 5.11. Schematische Darstellung des Messprinzips der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität.

Die LDH bewerkstelligt die Umsetzung von Na-Pyruvat in Laktat. Dabei wird NADH zu NAD^+ oxidiert, welches im Photometer visualisiert werden kann.

5.2.3.2.7 Messung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Messung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität, welche sowohl im Citratzyklus, als auch an der Elektronentransportkette beteiligt ist, wird als Referenz zur Kontrolle der gleichmäßigen Präparation der Zellen verwendet. Die Succinat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat, wobei Ubiquinone reduziert wird. Dieses wiederum kann seine Elektronen auf den artifiziellen Elektronenakzeptor DPIP übertragen, welcher dadurch seine Farbe von blau in farblos ändert (Abbildung 5.12.) (Hatefi & Stiggall 1978).

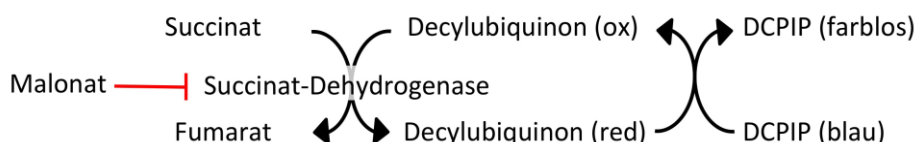


Abbildung 5.12. Schematische Darstellung des Messprinzips der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität.

Die Succinat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat. Dabei wird Decylubiquinone reduziert. Dieses wiederum kann seine Elektronen auf den artifiziellen Elektronenakzeptor DPIP übertragen, welcher dadurch seine Farbe von blau in farblos ändert. Die Abnahme der Färbung kann dann im Photometer detektiert werden. Malonat ist ein spezifischer Inhibitor der SDH und wird den Referenzproben zugesetzt, um SDH-unabhängige Änderungen der Extinktion zu berücksichtigen.

Für die Messung werden 6-, 9- und 12 µl des Lysats in Duplikaten in einer UV-Mikrotiterplatte vorgelegt und der entsprechende Reaktionsmix für die Proben und die Referenzen hinzugegeben.

Reagenz	Probe	Referenz
Succinat-Dehydrogenase-Assay-Puffer	240 µl	240 µl
KCN (in H ₂ O)	50 µg/ml	50 µg/ml
DBQ (5 mM in Ethanol)	10 µl/ml	10 µl/ml
Succinat (20 %)	10 µl/ml	10 µl/ml
Malonat	--	10 µl/ml

Um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen, wird Malonat zu den Referenzproben hinzugegeben. Malonat ist ein Kompetitiver Inhibitor der Succinat-Dehydrogenase und wirkt, indem es an das aktive Zentrum des Enzyms bindet und dort mit dem natürlichen Substrat Succinat um die Bindestelle konkurriert.

Die Messung der Veränderung der Extinktion von DCPIP findet über einen Zeitraum von 30 min ca. alle 17 sek bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ statt und der Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Die SDH-abhängige Extinktionsänderung ergibt sich aus der

Differenz der Extinktionsänderung der Proben und der dazugehörigen unspezifischen Extinktionsänderung der Referenzproben, welche durch Zugabe von Malonat bestimmt werden kann. Die Berechnung der Aktivität erfolgt wie in 5.2.3.2.2 beschrieben.

5.2.3.2.8 Messung der Cytochrom-c-Oxidase Aktivität

Auch die Messung der Cytochrom-c-Oxidase Aktivität wird als Referenz zur Kontrolle der gleichmäßigen Präparation der Zellen genutzt.

Für die Messung werden 5-, 10-, 15- und 20 µl des Lysats in einer UV-Mikrotiterplatte vorgelegt und der entsprechende Reaktionsmix für die Proben und die Referenzen hinzugegeben. In diesem Reaktionsansatz wird kein Substrat umgesetzt, weshalb ein Reaktionsmix ohne Substrat auch nicht als Hintergrundmessung verwendet werden kann. Deshalb wird zu diesem Zweck der Reaktionsmix ohne Zelllysate verwendet.

Reagenz	Probe	Referenz
Cytochrom-c-Oxidase-Assay-Puffer	230 µl	230 µl
Cyt-c (275 µM)	7,5 µl	7,5 µl
Zelllysate	4,25, 8,5, 12,75 bzw. 17 µg	--

Die Messung basiert auf der Absorptionsänderung von reduziertem zu oxidiertem Cytochrom-c bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550 \text{ nm}$ (Abbildung 5.13.). Der Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon = 19,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und die Messdauer beträgt 20 min und findet alle 14 sek statt. Die Berechnung der Aktivität erfolgt wie in 5.2.3.2.2 beschrieben.

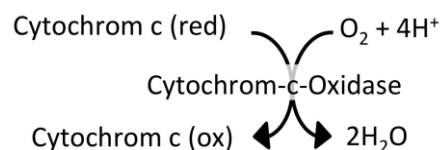


Abbildung 5.13. Schematische Darstellung des Messprinzips der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität.

Cytochrom-c wird durch die Cytochrom-c-Oxidase oxidiert. Die dadurch entstehende Absorptionsänderung kann im Photometer detektiert werden.

5.2.3.3 Detektion von phosphorylierter Pyruvat-Dehydrogenase und deren Gesamtmenge

Der Pyruvat-Dehydrogenase Komplex ist ein Schlüsselregulator im Energiemetabolismus der Zelle. Die Aktivität der PDH wird über die PDH Kinasen (PDKs) und die PDH Phosphatasen (PDPs) reguliert, die an den drei Phosphorylierungsstellen Ser232, Ser293 und Ser300 an der

E1 α -Untereinheit agieren können. In dieser Arbeit wurde die Gesamtmenge an PDH in den verschiedenen untersuchten Zellen mit Hilfe des Bio-Plex MAGPIX Multiplex Readers überprüft und gleichzeitig der Phosphorylierungszustand der Serinreste untersucht. Dazu wurden die Zellen im jeweiligen Kulturmedium so ausgesät, dass sie am Folgetag zu 80 % konfluent waren. Zur Entfernung des im Kulturmedium vorhandenen Pyruvats fand am nächsten Tag zunächst ein Mediumwechsel auf *low-buffered* DMEM nach zweimaligen Waschen mit diesem Medium statt. Pyruvat hat einen aktivierenden Effekt auf die Aktivität der PDK, was das Experiment stören könnte. Anschließend wurden die Zellen für 2 h an das neue Medium adaptiert, bevor die Stimulation mit 40 mM DCA stattfand. Anschließend findet die Ernte der Proben statt. Dafür werden die Zellen zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann 300 μ l Lysepuffer hinzugegeben, der Phosphatase-Inhibitoren (1:50) und Protease-Inhibitoren (1:200) enthält. Mit einem Zellschaber werden die Zellen von der Platte geschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nun werden die Proben für 30 min bei 4°C auf dem Überkopftrotierer inkubiert, bevor die Zelltrümmer bei 14.000 rpm und 4°C für 20 min pelletiert werden. Der Überstand kann dann zur Messung eingesetzt werden.

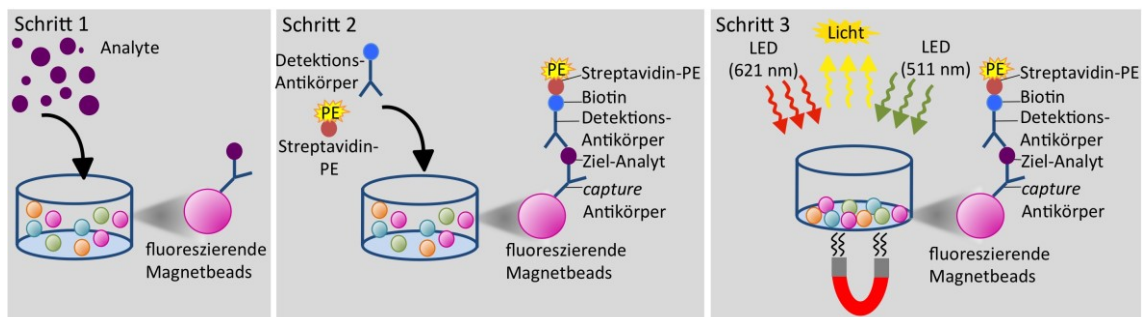


Abbildung 5.14. Das Luminex Assay Prinzip.

Schritt 1: Die Probe wird zu einem Mix aus farbkodierten Magnetbeads gegeben, die mit analytspezifischen Antikörpern bestückt sind. Die Antikörper binden die gewünschten Analyte. **Schritt 2:** Biotinylierte Detektions-Antikörper, welche spezifisch für den Zielanalyt sind werden hinzugegeben, wobei ein Antikörper-Antigen Sandwich gebildet wird. Anschließend wird Phycoerythrin (PE)-gekoppeltes Streptavidin hinzugegeben, welches an die biotinylierten Antikörper bindet. **Schritt 3:** Ein Magnet im MAGPIX Analyzer immobilisiert die Magnetbeads als Monolayer am *well*-Boden, während zwei LEDs mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften die *beads* anregen. Eine LED identifiziert den zu detektierenden Analyt über die farbkodierung des *beads* und die zweite LED bestimmt die Stärke des PE-Signals. Jedes *well* wird mit einer CCD Kamera abgebildet. (Modifiziert nach R&D Systems)

Vor der Messung werden zunächst die Gesamtproteinmengen mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford gemessen, um dann für alle Proben gleiche Gesamtproteinmengen einsetzen zu können, um eine Vergleichbarkeit der Proben garantieren zu können. Dabei wurde von jeder Probe 5 μ l mit 45 μ l Wasser 1:10 verdünnt und mit 200 μ l

der Bio-Rad Protein Assay Lösung versetzt und die Proteinkonzentration der Proben, wie bereits beschrieben ermittelt (5.2.2.2).

Die Messung basiert auf der Luminex xMAP® Technologie und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Abbildung 5.14.). Bei der Luminex xMAP® Technologie verwendet man farbmarkierte fluoreszierende Magnetbeads, die mit einem spezifischen *capture*-Antikörper bestückt sind. Das System erlaubt die gleichzeitige Messung mehrerer Analyte in der selben Probe (Multiplex), da die Magnetbeads unterschiedlich farbkodiert sind und damit unterschieden werden können.

Für die Detektion von phosphorylierter Pyruvat-Dehydrogenase und deren Gesamtmenge wurden von jeder Probe 10 µg Gesamtprotein in einem Gesamtvolumen von 25 µl in Assay-Buffer eingesetzt. Dazu werden 25 µl der *beads*-gekoppelten Antikörper gegeben. Die Zielanalyte aus dem Proteinlysate binden während einer zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler an den entsprechenden Antikörper und der Rest der Proteine wird herausgewaschen. Die Proben werden hierbei mit Hilfe einer Magnetplatte gewaschen, die die Magnetbeads am Plattenboden arretieren.

Als nächstes werden 50 µl des biotinylierten Detektions-Antikörpers hinzugegeben, der an den über den *capture*-Antikörper am Magnetbead gekoppelten, Analyten bindet. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler erfolgt erneut ein Waschschriff, um nichtgebundene Detektionsantikörper zu entfernen. Als nächstes erfolgt eine 30-minütige Inkubation mit 50 µl Streptavidin-Phycerythrin (Streptavidin-PE), welches als Reportermolekül dient. Streptavidin bindet dabei an das Biotin des Detektionsantikörpers. Anschließend findet erneut ein Waschschriff statt. Nach dem Resuspendieren der Proben in 100 µl Drive Fluid schließt sich die Messung an. Dabei werden die Magnetbeads durch einen Magneten am Boden des *wells* als Monolayer immobilisiert. Nun werden sie durch zwei LEDs, die unterschiedliche spektrale Eigenschaften besitzen, angeregt. Durch die Anregung der ersten LED fluoreszieren die *bead*-internen Farben, wodurch der zu bestimmende Analyt identifiziert wird. Durch die Bestrahlung mit der zweiten LED wird PE, der Fluoreszenzfarbstoff am Reportermolekül, angeregt. Hochleistungsprozessoren identifizieren dann die individuellen Magnetbeads und quantifizieren die Menge gebundener Analyte durch die Stärke des Fluoreszenzsignals des Reporter-Moleküls (PE).

5.2.3.4 Echtzeit-Zellanalyse mit dem xCELLigence RTCA (real time cell analyzer)

Der xCELLigence RTCA DP verwendet nicht invasive elektrische Impedanzmessungen zur Bestimmung von Zellproliferation, Morphologieänderungen und Qualität der Zellanheftung in Echtzeit. Wechselwirkungen der Zellen mit den elektronischen Biosensoren werden dabei in einem speziellen 16-*well* Schlitten mit der Dimension eines 96-*wells* gemessen. Die Echtzeitmessung des Wechselstromwiderstandes liefert dabei genaue Informationen von experimentellen Einflüssen auf den Zellstatus. Im Gegensatz zu den üblichen Endpunkt-Assays erhält man einen genauen Verlauf der Wirkung einer Substanz auf den Zellstatus über Stunden bis Tage.

5.2.3.4.1 Komponenten des Systems

Das xCELLigence-System besteht aus einer Analyseeinheit, welche sich im 37°C Zellkulturinkubator befindet und einer Kontrolleinheit in Form eines Laptops mit der dazugehörigen Analysesoftware außerhalb des Inkubators. Auf der Analyseeinheit werden die sogenannten E-Platten befestigt, ein 16-*well* Schlitten mit der Dimension eines 96-*wells*. Die Analyseeinheit misst mit Hilfe der RTCA Software über die Sensorelektroden am *well*-Boden der E-Platten die elektronische Impedanz (Wechselstromwiderstand), die die Zellen erzeugen.

5.2.3.4.2 Messprinzip des xCELLigence RTCA

Das Messprinzip beruht auf einer Messung der Impedanz (Z), die durch die Zellen erzeugt wird in Echtzeit. Dazu befinden sich auf dem Boden eines jeden *well*s einer sogenannten E-Platte fingerartig ineinandergreifende Gold-Mikroelektroden-Sensoren. Die relativen Änderungen der elektrischen Impedanz werden als ein dimensionsloser Parameter dargestellt und Zellindex (CI) genannt (Xiao *et al.* 2002). Da die Zellmembran isolierende Eigenschaften besitzt, verhalten sich die Zellen wie ein Dielektrikum, welche den Widerstand erhöhen. Befindet sich keine Zelle auf den Mikroelektroden am Plattenboden, sind die Impedanz und damit auch der Zellindex null. Je mehr Zellen und je stärker sie auf der Elektrode adhärieren, umso stärker steigt die Impedanz. Auch die zweidimensionale Ausbreitung der Zellen und die Qualität der Anheftung beeinflussen die Impedanz und damit den Zellindex (Abbildung 5.15.).

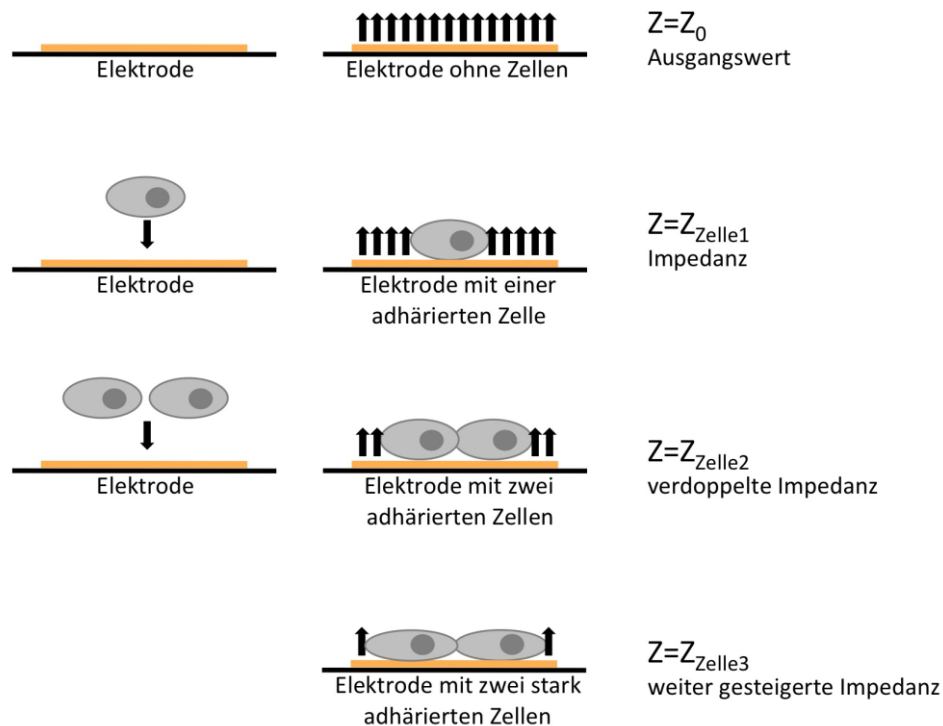


Abbildung 5.15. Schematische Darstellung des Impedanz-Messprinzips des xCELLigence Systems.

Ohne Zellen ist die Impedanz (Z) minimal und wird als Ausgangswert zur Kalkulation des Zellindex als null definiert. Adhärirt eine Zelle auf der Goldelektrode, steigt die Impedanz an. Teilt sich die Zelle, so ist auch die Impedanz verdoppelt. Durch stärkeres Adhärrieren der Zellen wird die Impedanz noch weiter gesteigert. (Verändert nach ACEA Bioscience, San Diego)

5.2.3.4.3 Optimierung der Zellzahl für xCELLigence RTCA-Messungen

Um eine Messung für eine Zelllinie neu zu etablieren, ist die Bestimmung der geeigneten Zellzahl notwendig. Bei der Zellzahl-Titration ist darauf zu achten, dass die Impedanzmessung einen einheitlichen Verlauf aufweist und die Verdopplungszeit in unterschiedlichen Zeitabschnitten gleich bleibt. Außerdem sollte der maximale Zellindex, abhängig von der Fragestellung, erst nach einigen Tagen erreicht sein.

Anhand der spezifischen Wachstumseigenschaften der Zellen wurden für die nachfolgenden Versuche auf folgende etablierte Zellzahlen zurückgegriffen (Tabelle 5.6.):

Tabelle 5.6. Etablierte Zellzahlen für Messungen mit dem xCELLigence RTCA DP

Zellart	Zellzahl
SKOV-3	5.000
OVCAR-3	10.000
IGROV-1	5.000
HEY	10.000
A549	5.000
HeLa	10.000
MCF-7	10.000
MCF-10A	10.000
OC_38	5.000
OC_91 <30 µm	2.500
OC_91 >30 µm	2.500
OC_92	5.000
OC_108	5.000
OC_119	2.500
OC_122	1.250
OC128	2.500

5.2.3.4.4 Proliferationsmessungen mit dem xCELLigence-System

Mittels Impedanzmessung wurde die Proliferation der Zellen unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Zu Beginn einer jeden Messung werden zunächst 100 µl des Zell- bzw. Assay-spezifischen Mediums in die *wells* gegeben und nach einer 30-minütigen Äquilibrationsphase im Inkubator, die der Reduktion von Temperaturschwankungen innerhalb des Systems dient, eine Messung des Hintergrundes durchgeführt. Diese Werte dienen dann als Referenz-Impedanz-Werte, um den Zellindex zu berechnen. Anschließend plattiert man die Zellen in 100 µl des jeweiligen Mediums in einer, in einem Vorexperiment optimierten Zellzahl (5.2.3.4.3.).

Nach dem Plattieren der Zellen verbleibt die E-Platte für 30 min bei Raumtemperatur unter der Sterilbank, damit die Zellen sedimentieren und so ein gleichmäßiges Verteilen dieser gewährleistet ist. Nun kann die E-Platte in der Messeinheit arretiert und die Messung gestartet werden. Dabei wird alle 30 Minuten der Zellindex dokumentiert. Nachdem die Proliferation der Zellen sichergestellt ist, kann mit der Zugabe von Substanzen begonnen werden. Dies geschieht für die Zelllinien nach etwa 24 h, bei primären Tumorzellen wurden erst nach etwa 48 h Substanzen hinzugefügt. Im Anschluss wurde weiterhin für drei bis fünf Tage die Impedanz alle 30 min gemessen.

Zur Auswertung wird der Zellindex einer jeden Zelllinie mit den unterschiedlichen Behandlungen in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Dabei ist es auch möglich, den

normalisierten Zellindex mit Hilfe der RTCA-Software berechnen zu lassen. Dieser wird aus dem Zellindex zu einem bestimmten Zeitpunkt durch den Zellindex zum Normalisierungszeitpunkt berechnet. Dadurch ist der normalisierte Zellindex für alle *wells* zum Normalisierungszeitpunkt eins.

Des Weiteren wurde mit Hilfe der RTCA-Software auch die Verdopplungszeit der Zellen unter den verschiedenen Bedingungen während der exponentiellen Wachstumsphase berechnet. Die Verdopplungszeit beschreibt die Zeit, die für eine Verdopplung des Zellindex benötigt wird, abhängig vom Kurvenverlauf im gewählten Zeitraum.

5.2.3.5 Metabolische ^{13}C -Stoffflussanalyse

Die metabolische ^{13}C -Stoffflussanalyse wird dazu genutzt, die intrazellulären Reaktionsraten besser verstehen zu können. Man unterscheidet generell zwei Methoden der Stoffflussanalyse: Die eine basiert auf stöchiometrisch balancierten Stoffflüssen in einem angenommenen metabolischen Netzwerk. Dabei werden extrazelluläre Raten gemessen, um intrazelluläre Flüsse abzuschätzen. Bei der zweiten Methode zur Analyse metabolischer Stoffflüsse greift man auf die Verwendung von stabilen ^{13}C -Isotopen als *Tracer* zurück (Ahn & Antoniewicz 2011). In dieser Arbeit wurde die zweite Methode verwendet, um die Metabolisierung von 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Glukose und U- $^{13}\text{C}_5$ -Glutamin intrazellulär verfolgen zu können.

Für den Versuch werden die Zellen etwa 70 % konfluent im jeweiligen Kulturmedium ausgesät, sodass die Zellen sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und metabolisch aktiv sind. Nachdem sich die Zellen abgesetzt haben, oder am nächsten Tag findet ein Mediumwechsel statt. Dabei werden die Zellen je nach Versuchsansatz mit 2 mM U- $^{13}\text{C}_5$ -Glutamin oder 20 mM 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Glukose im Medium für mindestens 5 h oder über Nacht inkubiert. Gleichzeitig wird als Hintergrundkontrolle immer eine weitere Probe mitgeführt, die die gleichen Mengen unmarkiertes Glutamin bzw. Glukose enthalten.

Für die Gewinnung der wasserlöslichen Metabolite werden die Zellen zunächst von der Zellkulturschale mittels Trypsin abgelöst, gewaschen und gezählt. Je Probe werden für die Isolation 2×10^6 Zellen verwendet und diese in 400 μl eiskaltem Methanol gequenchet. Anschließend werden 400 μl H_2O mit 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Norvalin hinzugegeben. Norvalin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die als interner Standard genutzt wird. Als nächstes werden 800 μl eiskaltes Chloroform hinzugegeben und die Proben 1 min lang auf dem Vortexer durchmischt. Zur Phasentrennung werden die Proben nun für 5 min bei 14.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und dann die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Diese fand stets in der Core

Facility Metabolomics/Massenspektrometrie unter der Leitung von PD Dr. Andreas Nockher von Dr. Yvonne Schober bzw. Dr. Jelena Pesek statt. Hierbei wurde die Flüssigkeit, in der sich die wasserlöslichen Metabolite befinden, verdampft und die Metabolite wieder in 20 µl 2 % Methoxyamin-Hydrochlorid in Pyridin aufgenommen und die Proben 1,5 h bei 37°C inkubiert, um die Carbonylgruppen zu derivatisieren. Danach fand die tert-butyldimethylsilyl (TBDMS) Derivatisierung statt, indem 30 µl N-methyl-N (tert-butyldimethylsilyl)-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MBTSTFA) mit 1 % tert-butyldimethylchlorosilane (TBDMCS) zu den Proben gegeben wurden und 1 h bei 55°C inkubiert wurde. Dabei werden Carboxyl-, Hydroxyl, Amino, Imino oder Sulphonyl-Gruppen derivatisiert.

Die GC/MS Analyse wurde mit dem Gaschromatograph 7890A von Agilent mit einer 30 m CS-35 MS Kapillar-Trennsäule verknüpft an das Massenspektrometer 5975C von Agilent mit einer Elektronenstoßionisation von 70 eV durchgeführt. Es wurden 3 µl der Probe über den auf 270°C geheizten Einspritzblock injiziert. Dabei dient Helium mit einer Flussrate von 1 ml/min als inertes Trägergas. Die Ofentemperatur des Gaschromatographen betrug 100°C für 3 min und wurde dann schrittweise auf 300°C erhöht, wobei die Temperaturzunahme 3,5°C/min betrug. Die Auswertung erfolgt mittels der Agilent Auswerte-Software „Mass Hunter quantitative analysis“.

Das Massenspektrum ist eine zweidimensionale Darstellung der Ionenhäufigkeit, also der Intensität der Signale, gegen das Ionenmasse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z), welches die Maßzahl darstellt. Die Maßzahl entspricht in diesem Fall dem unmarkierten Analyt (Tabelle 5.7.). Weitere *peaks* im Massenspektrum entstehen in diesem Fall durch ein eingebautes Isotop höherer Masse, bei Verwendung von ^{13}C -markierten Substraten. So entspricht der M1 *peak* dem Einbau eines Isotopen mit höherer Masse, der M2 *peak* dem Einbau von zwei Isotopen höherer Masse usw. Die *peak*-Fläche ist dabei proportional zur Substanzmenge.

Tabelle 5.7. Darstellung der erwarteten Maßzahlen für die analysierten Metabolite (Ahn & Antoniewicz 2011)

Metabolit	Maßzahl (m/z)	Kohlenstoff-Atome	Fragment-Formel
Aspartat	418	1-2-3-4	$\text{C}_{18}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{NSi}_3$
Citrat	459	1-2-3-4-5-6	$\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{Si}_4$
Glutamat	432	1-2-3-4-5	$\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{NSi}_3$
α -Ketoglutarat	346	1-2-3-4-5	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{NSi}_2$
Laktat	261	1-2-3	$\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{O}_3\text{Si}_2$
Malat	419	1-2-3-4	$\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{O}_5\text{Si}_3$
Pyruvat	174	1-2-3	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{NSi}$
Serin	390	1-2-3	$\text{C}_{17}\text{H}_{40}\text{O}_3\text{NSi}_3$

5.2.3.6 Colorimetrische Bestimmung von Glykogen

Glykogen stellt beim Menschen die Hauptspeicherform von Kohlenhydraten dar und kann schnell zu Glukose abgebaut werden. Obwohl Glykogen hauptsächlich in der Leber und im Muskel vorkommt, verdichten sich in den letzten Jahren die Hinweise darauf, dass auch in Tumorzellen der Glykogenmetabolismus eine große Rolle spielt (Zois *et al.* 2014).

Die Messung des Glykogenlevels wurde mit Hilfe des Glykogen Assay Kits II (Abcam, Cambridge) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Herstellung der Proben wurden die Zellen am Vortag 2×10^6 Zellen im entsprechenden Kulturmedium auf einer Schale mit 10 cm Durchmesser ausplattiert. Um Glukoserückstände, welche die Messung stören würden, aus dem Medium zu eliminieren, werden die Zellen am nächsten Tag zunächst dreimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 100 μ l eiskaltem Glykogen Hydrolyse-Puffer durch Abschaben geerntet, in ein Reaktionsgefäß überführt und 10 min auf Eis lysiert. Entstandene Zelltrümmer werden durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Vergleichbarkeit der Proben wurde nun noch eine Messung des Gesamtproteingehalts durchgeführt. Dabei wurden 5 μ l der Proben mit 45 μ l Wasser 1:10 verdünnt und davon 4 μ l zur Proteinbestimmung nach Bradford in 200 μ l der Bio-Rad Protein-Assay-Lösung eingesetzt (5.2.2.2.).

Nach diesem Schritt wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Messung des Glykogengehalts wird von jeder Probe 16,5 μ g Gesamtprotein eingesetzt, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Zelllinien zu erreichen. Nun wird das Volumen auf 50 μ l mit Glykogen Hydrolyse-Puffer angeglichen. Anschließend erhalten alle Proben 2 μ l des Hydrolyse Enzym-Mixes. Dieser hydrolysiert Glykogen zu Glukose, die dann oxidiert wird, wobei H_2O_2 entsteht, welches den farblosen Farbstoff zu einer einem gefärbten Produkt mit einer starken Absorption bei 450 nm reduziert (Abbildung 5.16.).

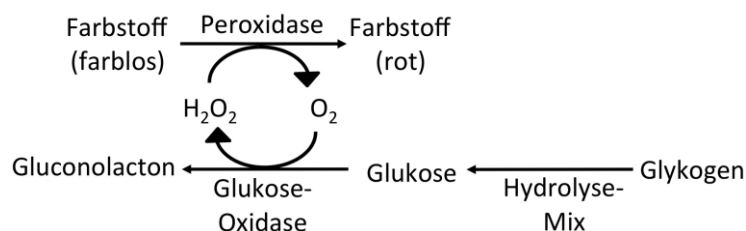


Abbildung 5.16. Prinzip der gekoppelten enzymatischen Reaktion zum Nachweis von Glykogen.

Durch die Oxidation von Glukose durch die Glukose-Oxidase in Gluconolacton entsteht H_2O_2 . Dieses wiederum ist gekoppelt mit der Peroxidase-Reaktion, welche dazu führt, dass ein farbloser Farbstoff rot wird.

Für jede Probe wird zusätzlich eine Hintergrund-Kontrollmessung durchgeführt, die dazu dient, die bereits in der Probe befindliche Glukose zu detektieren und von den Glykogenwerten abziehen zu können. Diese Proben erhalten keinen Hydrolyse-Enzym-Mix. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wird anschließend der Reaktionsmix hinzugegeben. Dabei erhalten die Proben 48 µl des Proben-Mixes und die Hintergrundproben 50 µl des Hintergrund-Kontroll-Mixes:

	Proben-Mix	Hintergrund-Kontroll-Mix
Glykogen Entwickler-Puffer	44 µl	46 µl
Entwickler-Enzym-Mix	2 µl	2 µl
Farbstoff	2 µl	2 µl

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min werden die Proben dann bei 450 nm im Photometer gemessen. Zur Quantifizierung des Glykogengehalts dienen die Extinktionswerte der Standardreihe, woraus eine Eichkurve erstellt wird. Anhand der Steigung der Ausgleichsgeraden kann dann der Glykogengehalt der einzelnen Proben berechnet werden.

5.2.3.7 MTT-Test

Mit Hilfe des MTT-Tests (Mosmann 1983) kann die metabolische Aktivität von Zellen bestimmt werden. Die Zellen werden in vivo mit dem gelben Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT) behandelt. MTT wird durch Dehydrogenasen lebender Zellen metabolisiert und in das blau-violette, wasserunlösliche Formazan umgesetzt. Diese Formazan-Kristalle sind nicht mehr membrangängig und akkumulieren in proliferierenden, ungeschädigten Zellen. Nach Lyse der Zellen und Solubilisierung der Kristalle kann der Farbstoff anschließend durch colorimetrische Messung bei 550nm in einem Multiwell-Spektrophotometer quantifiziert werden. Die Menge an produziertem Formazan ist direkt proportional zur Zellzahl, weshalb dieser Test häufig zur Bestimmung dieser eingesetzt wird.

In dieser Arbeit wurde der MTT-Test dafür verwendet, Chemosensitivitäten durch metabolische Inhibitoren zu überprüfen. Dazu wurden die Zellen zunächst in einer Zelllinien-spezifischen Zellzahl (Tabelle 5.8.) in 50 µl des jeweiligen Kulturmediums ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht sedimentiert und angewachsen sind, wurden sie am Folgetag mit Inhibitoren und/oder Chemotherapeutika behandelt, welche in zweifacher Ausgangskonzentration in 50 µl des jeweiligen Kulturmediums zu den Zellen gegeben wurden. Am 5. Tag nach der Behandlung werden schließlich 10 µl MTT-Reagenz (5 mg/ml PBS) zu den Zellen gegeben und diese für 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Da das im Medium enthaltende Phenolrot die Messung stören könnte, findet zuvor eine 1:1 Verdünnung mit Phenolrot-freiem

RPMI statt, indem 100 µl des Phenolrot-freiem RPMI in jedes *well* hinzugegeben und dann 100 µl wieder entnommen werden. Danach erfolgt die Zugabe von 100 µl Solubilisierungslösung und eine weitere Inkubation über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂. Die Messung findet in Triplikaten mit einem Multiwell-Spektrophotometer bei A560 statt, als Referenzwert dient die Messung bei A690, die direkt bei der Messung subtrahiert wurde.

Tabelle 5.8. Zelllinien-spezifische Zellzahl für den MTT-Test

Zelllinie	Zellzahl
OC_38	2000
OC_91 <30 µm	1000
OC_91 >30 µm	1000
OC_92	2000
OC_108	2000
OC_119	2000
OC_122	1000
OC128	1000
SKOV-3	1000
MCF-10A	1000

5.2.4 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden als Screen angelegt. Da hierbei auf eine größere Menge unterschiedlicher Zelllinien zurückgegriffen wurde und eine Reihe metabolischer und wachstumsspezifischer Parameter untersucht werden sollten, wurden initiale Experimente mit dem Seahorse-XFe-Analyzer und dem xCELLigence RTCA aus Kostengründen zunächst nur einmal durchgeführt. Die Titrations der angewendeten Substanzen und deren konzentrationsabhängige Wirkung ließen sich dann in den finalen Experimenten mindestens ein weiteres Mal bestätigen.

Bei der Darstellung der Ergebnisse der Seahorse-XFe-Analyzer und xCELLigence RTCA Messungen wurde, wenn nicht anders vermerkt, immer nur auf exemplarische Einzelmessungen mit mindestens 6 technischen Replikaten bei Seahorse-Messungen und 2 technischen Replikaten bei xCELLigence-Messungen zurückgegriffen.

Bei der weiteren Auswertung wurden die OC-Zellen als biologische Replikate angesehen und zusammengefasst.

Um Signifikanzen zu berechnen wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-test mit Hilfe der Software „GraphPad t-test calculators“ (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=SD>) angewendet.

6 Ergebnisse

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung OC-Zellen, die aus Aszites isoliert wurden. Da die Kultur primärer Zellen sehr aufwendig ist und es wesentlich länger dauert, die für die Experimente benötigten Zellzahlen zu erhalten, sollte ein Modellsystem für diese Zellen gefunden werden. Zu diesem Zweck wurden die etablierten Ovarialkarzinom-Zelllinien SKOV-3, OVCAR-3, IGROV-1 und HEY (5.1.5.) für die Etablierung der Analysemethoden und als Kontrolle mitgeführt. Außerdem dienten die Lungenkrebs-Zelllinie A549, die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa und die Brustkrebszelllinie MCF-7 als Vergleich, um Ovarialkarzinom-spezifische Effekte zu identifizieren. Die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A wurde als Kontrolle für normales Gewebe ebenfalls untersucht.

6.1 Vergleichende Expressionsuntersuchung wichtiger am Metabolismus beteiligter Schlüsselenzyme in OC-Zellen, etablierten Tumorzelllinien und der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Expression verschiedener metabolischer Schlüsselenzyme untersucht werden, um eine Übersicht über mögliche deregulierte Gene zu erhalten. Wie bereits einleitend beschrieben, liegt eine Vielzahl von Metabolismus-assoziierten Genen im Zusammenhang mit Tumoren dereguliert vor. Neben den Genen, die bereits dafür bekannt sind eine veränderte Expression aufzuweisen, wurden auch weitere Gene untersucht, um ein möglichst vollständiges Expressionsprofil zu generieren. Die Expressionsanalysen sollten dazu dienen, Rückschlüsse auf präferenziell genutzte Stoffwechselwege ziehen zu können. Dazu wurde aus OC-Zellen, aus etablierten Tumorzelllinien und der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A mRNA isoliert (5.2.2.1.1.), in cDNA umgeschrieben (5.2.2.1.3.) und mittels RT-qPCR (5.2.2.1.4.) die Expression entsprechender Gene auf Transkript-Ebene untersucht.

Entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu einem speziellen Stoffwechselweg wurden die analysierten Gene in Gruppen zusammengefasst: Glykolyse-assoziierte Gene (vgl. Abbildung 6.1. A), Fettsäuremetabolismus-assoziierte Gene (vgl. Abbildung 6.2. A), Citratzyklus-assoziierte Gene (vgl. Abbildung 6.3. A) und Atmungskette-assoziierte Gene (Abbildung 6.4. A)

6.1.1 Glykolyse-assoziierte Gene

Eine potentiell gesteigerte Glykolyse könnte durch eine gesteigerte Expression Glykolyse-assoziiierter Enzyme verursacht sein. Aus diesem Grund wurde die Expression der Glukosetransporter *GLUT1* und *GLUT3*, der Hexokinase (*HK2*) und die Pyruvatkinase M2 (*PK-M2*), welche spezifisch für proliferierende Gewebe ist, untersucht. Des Weiteren wurde die Expression der Gene analysiert, welche man im Zuge des Warburg-Effektes als gesteigert erwarten würde. Diese sind die Laktat-Dehydrogenase (*LDHA* und *LDHB*) und die Monocarboxylat-Transporter *MCT1* und *MCT4*, welche für die Ausschleusung des Laktats und damit für die pH-Homöostase der Zelle notwendig sind. Weiterhin ist ein wichtiger Regulator der Glykolyse die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH), welcher die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert. Eine der Komponenten der PDH ist die E1-Untereinheit, die durch das Gen *PDHA1* kodiert wird, das aktive Zentrum enthält und eine Schlüsselfunktion in der Funktionalität der PDH spielt. Aus diesem Grund findet die Expressionsanalyse von *PDHA1* statt. Die Aktivität der PDH wird u.a. durch die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (*PDK1*, *PDK2*, *PDK3*, *PDK4*) reguliert, welche die PDH inhibitorisch phosphorylieren (vgl. 4.3.1.). Aus diesem Grund wurde auch die Expression dieser Gene untersucht (Abbildung 6.1. A).

Das Expressionsmuster wird im Folgenden als einheitlich oder nicht heterogen bezeichnet, wenn die relativen Cts innerhalb einer Gruppe weniger als 2 Ct auseinander liegen, während eine Abweichung von mehr als 2 Ct als heterogenes Expressionsmuster betrachtet wird (1 Ct entspricht einem 2 fachen Unterschied). Die Untersuchung der Glykolyse-assoziierten Enzyme zeigen innerhalb der OC-Zellen ein sehr einheitliches Expressionsmuster (Abbildung 6.1. B). Ausnahmen stellen lediglich der Monocarboxylat Transporter 4 und die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 4 dar, bei denen das Expressionslevel innerhalb der patientenabgeleiteten Tumorzellen um mehr als 2 Ct schwankt. Weiterhin ist festzuhalten, dass alle Gene ein hohes Expressionslevel aufweisen, wobei besonders die beiden *LDH*-Untereinheiten wegen ihrer besonders starken Expression auffallen. Innerhalb der Gruppe der etablierten Tumorzellen und der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A ist das Expressionsmuster deutlich heterogener (Abbildung 6.1. C). Abgesehen von den Genen *GLUT1*, *LDHA*, *MCT1* und *PDK2* weisen alle Gene eine größere Streuung als 2 Ct auf. *LDHB* weist, abgesehen von den MCF-7 Zellen, in den übrigen Zellen ebenfalls ein einheitliches Expressionsmuster auf. Außerdem ist anzumerken, dass auch innerhalb dieser untersuchten Gruppe die Gene *LDHA* und *LDHB*, mit Ausnahme der MCF-7 Zellen, sehr stark exprimiert sind, auch in den MCF-10A Zellen, welche als nicht transformierte Zellen als Kontrolle mitgeführt wurden.

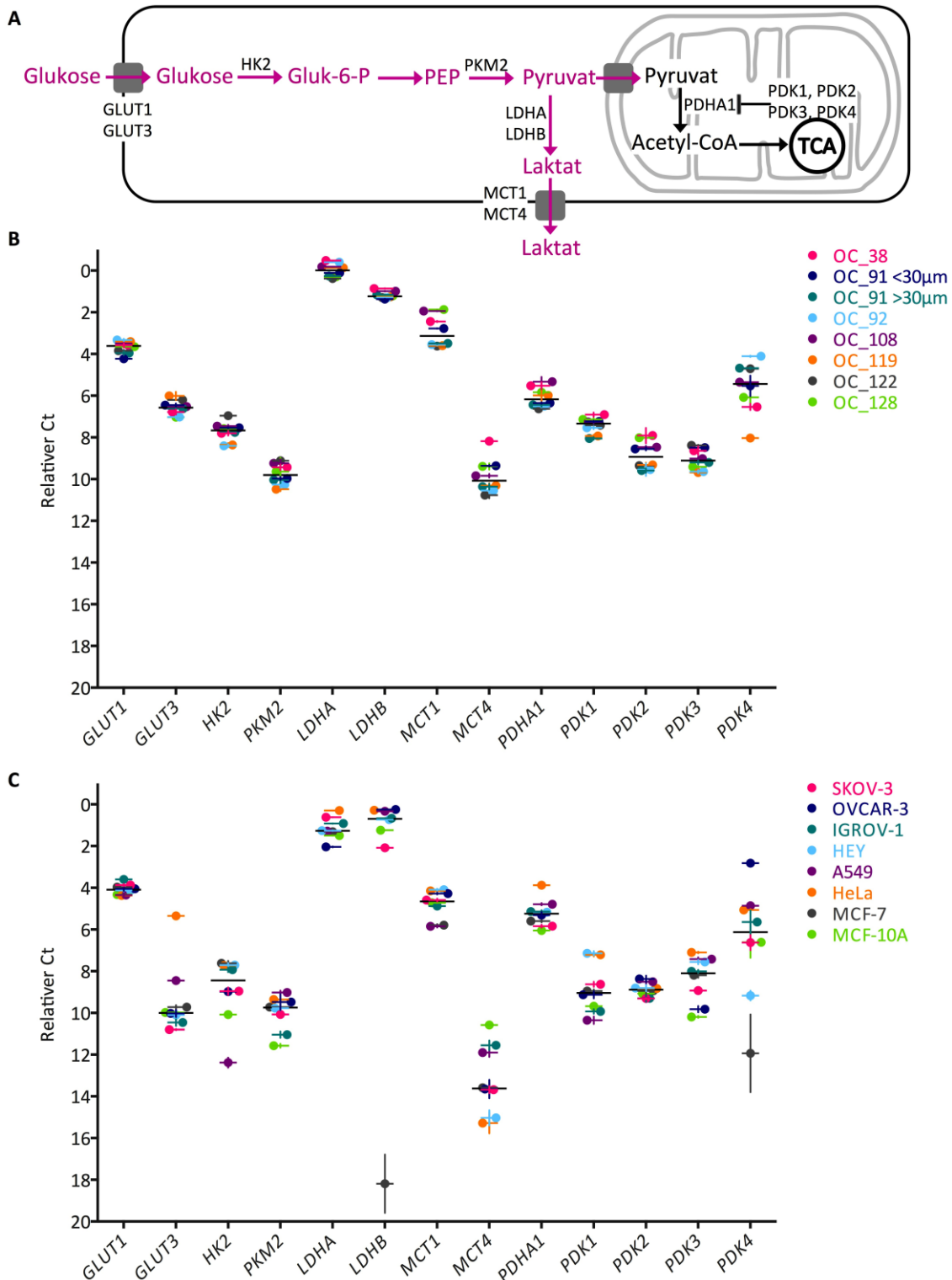


Abbildung 6.1. Expression metabolischer Schlüsselenzyme aus der Glykolyse

A) Vereinfachte Übersichtsdarstellung der analysierten Gene im Glukosemetabolismus. **B)** und **C)** Dargestellt ist der durchschnittliche, relative Ct aus Triplikaten verschiedener Gene im Glukosemetabolismus bezogen auf den Ct des Haushaltsgens *RPL27* in OC-Zellen (**B**) und etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A (**C**), die mittels RT-qPCR ermittelt wurde. Horizontale Striche kennzeichnen den Median des Expressionslevels innerhalb der untersuchten Gruppen.

6.1.2 Fettsäuremetabolismus-assoziierte Gene

Neben dem Glukosemetabolismus spielt auch der Fettsäuremetabolismus eine große Rolle für Krebszellen. Die *de novo* Synthese von Fettsäuren wird für die Synthese von Plasmamembran, also für die Proliferation von Zellen, benötigt (Carracedo *et al.* 2013). Ebenso ist der Abbau von Fettsäuren, die sogenannte β -Oxidation, wie einleitend bereits beschrieben (4.3.4.), von großer Bedeutung. Aus diesen Gründen sollte auch die Expression verschiedener Enzyme, die am Fettsäuremetabolismus beteiligt sind, untersucht werden. Dabei werden, die Fettsäuresynthese betreffend, die Expression der Gene *ACLY* (ATP-Citrat-Lyase), *ACACA* (Acetyl-CoA Carboxylase) und *FASN* (Fettsäure-Synthase) untersucht. Die β -Oxidation betreffend werden die Gene *CPT1 α* (Carnitin Palmitoyl-Transferase), *SLC25A20* (Carnitin-Acylcarnitin Translocase), welche für den Transport der Fettsäuren in das Mitochondrium zuständig sind, *ACAA2* (Acetyl-CoA Acyltransferase), welches den letzten Schritt der mitochondrialen β -Oxidation katalysiert und *MLYCD* (Malonyl-CoA-Decarboxylase), welches für die Umwandlung von Malonyl-CoA zu Acetyl-CoA zuständig ist, untersucht (Abbildung 6.2. A). Die mRNA-Level der untersuchten Gene innerhalb der Gruppe der OC-Zellen (Abbildung 6.2. B) weisen allesamt eine einheitliche Expression mit Schwankungen auf, die kleiner als 2 Ct sind. Innerhalb der etablierten Tumorzelllinien (Abbildung 6.2. C) und der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF10A als Kontrolle weist das Expressionslevel eine deutlich größere Heterogenität auf. Hier zeigen lediglich die Gene *SLC25A20* und *ACACA* eine relativ einheitliche Expression mit Schwankungen unter 2 Ct. Weiterhin fällt auf, dass das Gen *ACAA2* in den SKOV-3 Zellen nicht exprimiert zu sein scheint. Auch das Expressionslevel von *FASN* liegt in den SKOV-3 Zellen weit unterhalb des Expressionslevels der übrigen untersuchten Zelllinien.

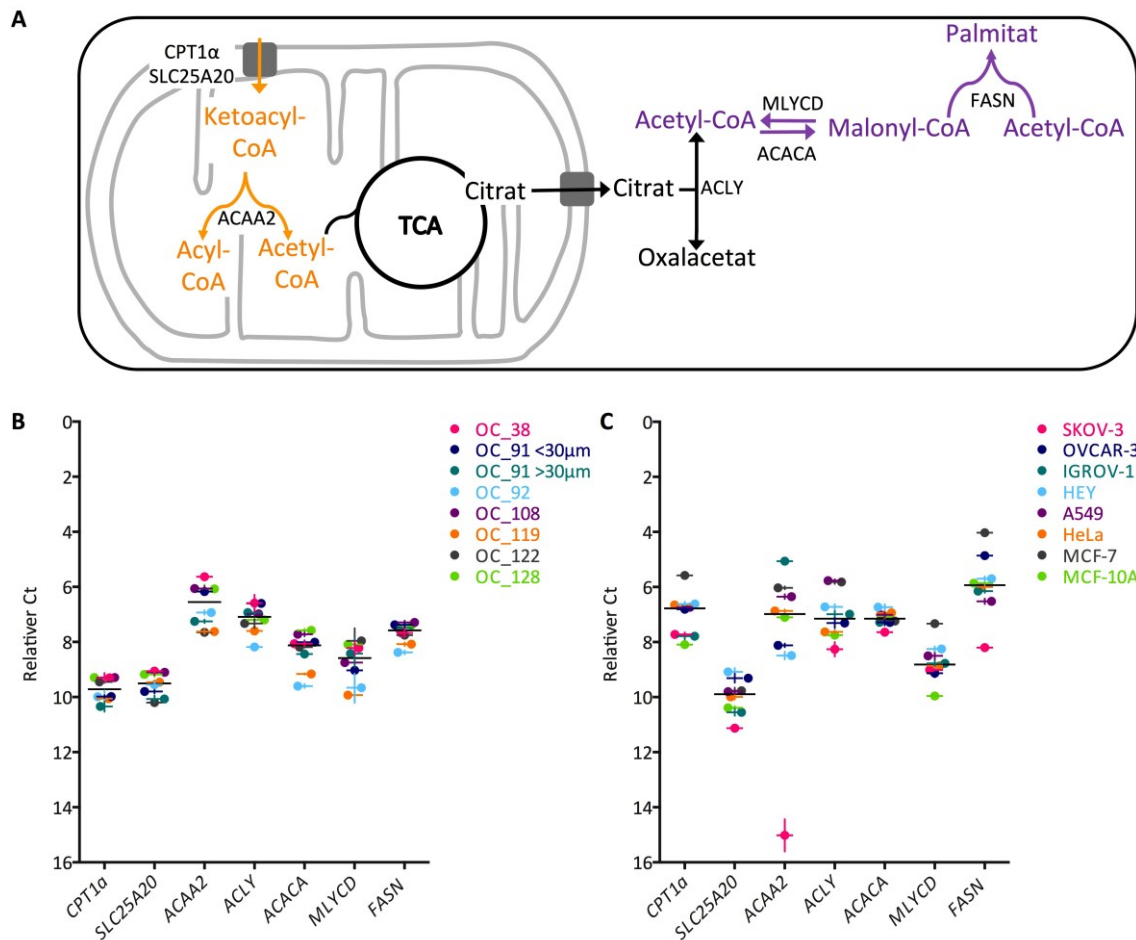


Abbildung 6.2. Expression metabolischer Schlüsselenzyme aus der β -Oxidation und der Fettsäuresynthese

A) Vereinfachte Übersichtsdarstellung der analysierten Gene aus β -Oxidation und der Fettsäuresynthese. **B)** und **C)** Dargestellt ist der durchschnittliche, relative Ct aus Triplikaten verschiedener Gene in der β -Oxidation (*CPT1 α* , *SLC25A20*, *ACAA2* und *MLYCD*) und der Fettsäuresynthese (*ACLY*, *ACACA* und *FASN*) bezogen auf den Ct des Haushaltsgens *RPL27* in OC-Zellen (B) und etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A (C), der mittels RT-qPCR ermittelt wurde. Horizontale Striche kennzeichnen den Median des Expressionslevels innerhalb der untersuchten Gruppen.

6.1.3 Citratzyklus-assoziierte Gene

Neben einer veränderten Expression Glykolyse-assoziiierter Gene und von Genen, die den Fettsäuremetabolismus betreffen, steht auch, wie eingangs beschrieben, eine veränderte Expression von Genen im Citratzyklus mit Krebs im Zusammenhang (Jang *et al.* 2013). Außerdem könnte auch eine gesteigerte aerobe Glykolyse mit einer verminderten Citratzyklusaktivität, bedingt durch eine verminderte Expression Citratzyklus-assoziiierter Gene, zu erklären sein. Zu diesem Zweck wurde die Expression folgender Schlüsselenzyme des Citratzyklus untersucht: *ACO2* (Aconitase 2), Isocitrat-Dehydrogenasen (*IDH2* und *IDH3α*), *SUCLG1* (Succinat-CoA-Ligase α), welche die Umwandlung von Succinyl-CoA zu Succinat katalysiert; *SDH* (Succinat-Dehydrogenase B oder C) und *FH* (Fumarat-Hydratase) (vgl. 4.3.2.). Außerdem fand die Analyse der Expression der Gene *ME3* (Malatenzym 3), welches die oxidative Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat mit NADP^+ als Co-Faktor katalysiert, *MDH* (Malat-Dehydrogenase), welches die Reaktion von Malat zu Oxalacetat katalysiert und *CS* (Citrat-Synthase) (Abbildung 6.3. A) statt.

Innerhalb der Gruppe der OC-Zellen weisen alle getesteten Proben eine einheitliche Expression aller TCA-assoziierten Gene auf (Abbildung 6.3. B). Einen Ausreißer stellt die Tumorzelllinie OC_92 da, deren Expression des Genes *IDH2* von den übrigen Tumorzelllinien dieser Gruppe abweicht und deutlich schwächer ist. Bei der Untersuchung der Gruppe der etablierten Tumorzelllinien und als Kontrolle der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A zeigt sich ebenfalls ein relative einheitliches Expressionsmuster in den untersuchten Genen (Abbildung 6.3. C). Lediglich die Gene *IDH2* und *ME3* weisen ein heterogenes Expressionsmuster auf. Dabei fällt vor allem auf, dass die nicht transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A in beiden Genen eine deutlich schwächere Expression zeigt. Hier scheint *ME3* gar nicht exprimiert zu sein, was ein deutliches Unterscheidungsmerkmal von der nicht-Tumorzelle zu den etablierten und auch zu den OC-Zellen darstellt. Auch die Brustkrebslinie MCF-7 zeigt bei der Expression des Genes *ME3* eine deutliche Verminderung des Transkriptlevels, im Vergleich zu den übrigen etablierten Tumorzelllinien.

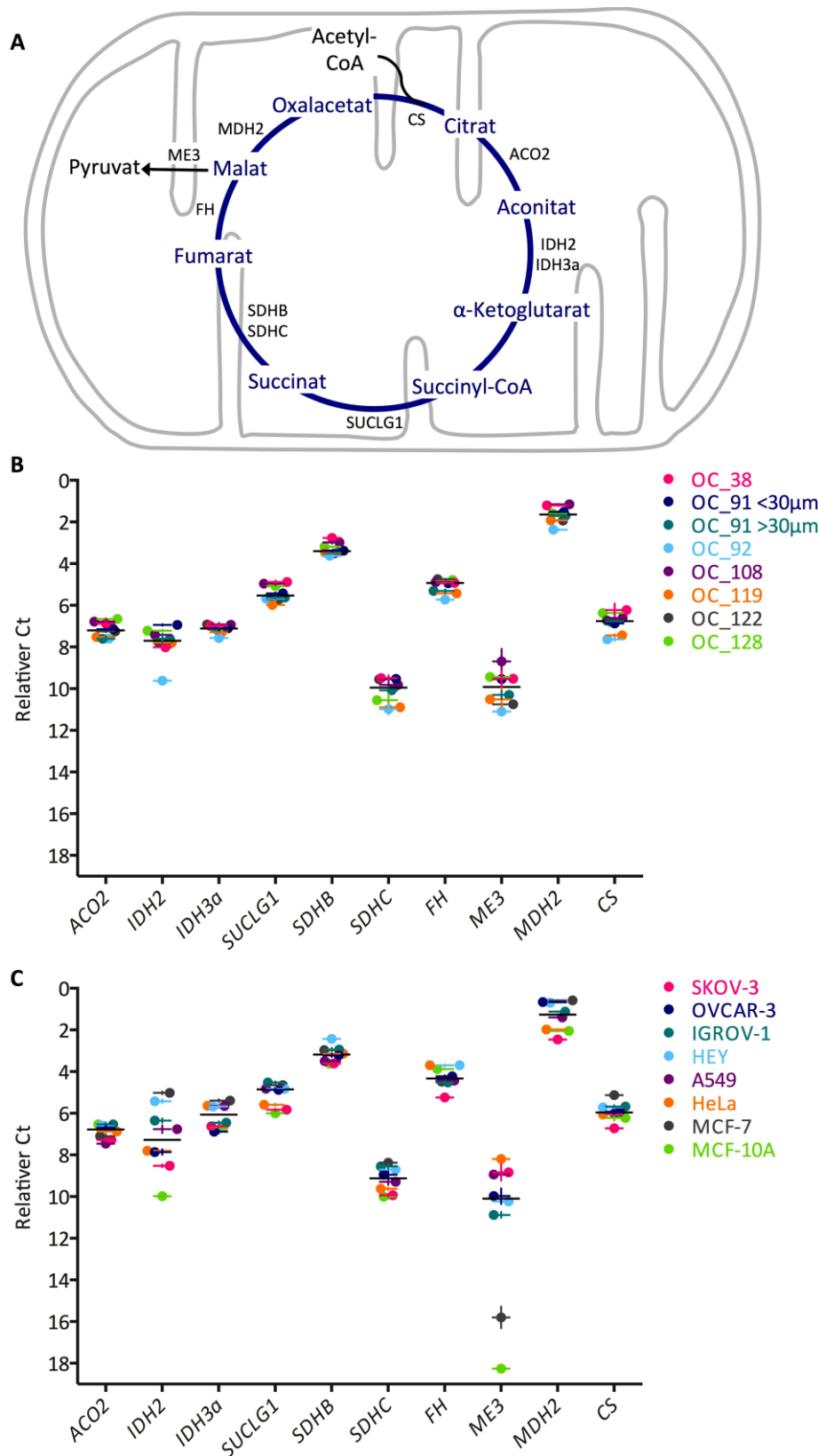


Abbildung 6.3. Expression metabolischer Schlüsselenzyme aus dem Citratzyklus

A) Vereinfachte Übersichtsdarstellung der analysierten Gene aus dem Citratzyklus. **B)** und **C)** Dargestellt ist der durchschnittliche, relative Ct aus Triplikaten verschiedener Gene des Citratzyklus bezogen auf den Ct des Haushaltsgens *RPL27* in OC-Zellen (**B**) und etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A (**C**), die mittels RT-qPCR ermittelt wurde. Horizontale Striche kennzeichnen den Median des Expressionslevels innerhalb der untersuchten Gruppen.

6.1.4 Atmungskette-assoziierte Gene

Ebenso wurden auch Gene der Atmungskette beobachtet, im Zusammenhang mit Tumoren zu stehen. Außerdem wäre auch eine gesteigerte aerobe Glykolyse aufgrund einer verminderten Funktionalität der Atmungskette denkbar. Aus diesem Grund wurde die Expression verschiedener Gene untersucht. Zusätzlich zu den Genen *SDHB* und *SDHC*, deren Funktion sowohl im TCA als auch in der Atmungskette von Bedeutung ist, wurden die Gene *ETFA* und *ETFB* (Elektron Transfer Flavoprotein A oder B), welche die Elektronen aus der β -Oxidation von der Flavoprotein-Dehydrogenase zur Membran gebundenen Elektron-Transfer Flavoprotein-Ubiquinon-Reduktase transferiert, untersucht. Auch *UQCRH* (Ubiquinol Cytochrom C Reduktase), auch als Komplex III der Atmungskette bekannt und *ATP5H* (ATP-Synthase), welche die ATP Synthese bewerkstelligt, indem sie sich während der oxidativen Phosphorylierung den elektrochemischen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran zunutze macht wurden analysiert (Abbildung 6.4. A).

Auch unter den hier untersuchten Genen ist das Expressionslevel innerhalb der OC-Zellen relativ einheitlich (Abbildung 6.4. B), lediglich OC_92 weist eine erhöhte *ATP5H*-Expression im Vergleich zu den übrigen primären Zelllinien auf. Innerhalb der Gruppe der etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A sind die Gene wesentlich heterogener exprimiert (Abbildung 6.4. C). Hierbei ist vor allem für das Gen *UQCRH* auffällig, dass die Expression wesentlich schwächer in den SKOV-3 Zellen ist, während die Expression dieses Genes in den übrigen Zelllinien einheitlich und deutlich stärker ist. Die Expression des Genes *ETFA* scheint in den Zelllinien MCF-7, HEY und A549 im Vergleich zu den anderen Zelllinien gesteigert zu sein und auch die Untersuchung der Expression des Genes *ATP5H* weist Auffälligkeiten auf. In diesem Fall ist die Expression in den HeLa Zellen deutlich gesenkt, während diese in den OVCAR-3 Zellen gegenüber den übrigen Zelllinien gesteigert zu sein scheint.

Zusammenfassend lässt sich anhand der Untersuchung der Expression metabolisch relevanter Gene sagen, dass sich die patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen in der Expression der untersuchten Gene sehr ähnlich sind, die etablierten Tumorzelllinien und die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A eine deutlich diversere Genexpression aufweisen. Außerdem unterscheiden sich die MCF-10A Zellen, welche als Kontrolle für nicht-Tumorzellen dienen, nur in wenigen Fällen von den Tumorzelllinien. Prinzipiell ist eine Regulation des Metabolismus über eine differenzielle Genexpression denkbar, eine genaue Aussage bezüglich der metabolischen Präferenz kann jedoch nicht getroffen werden.

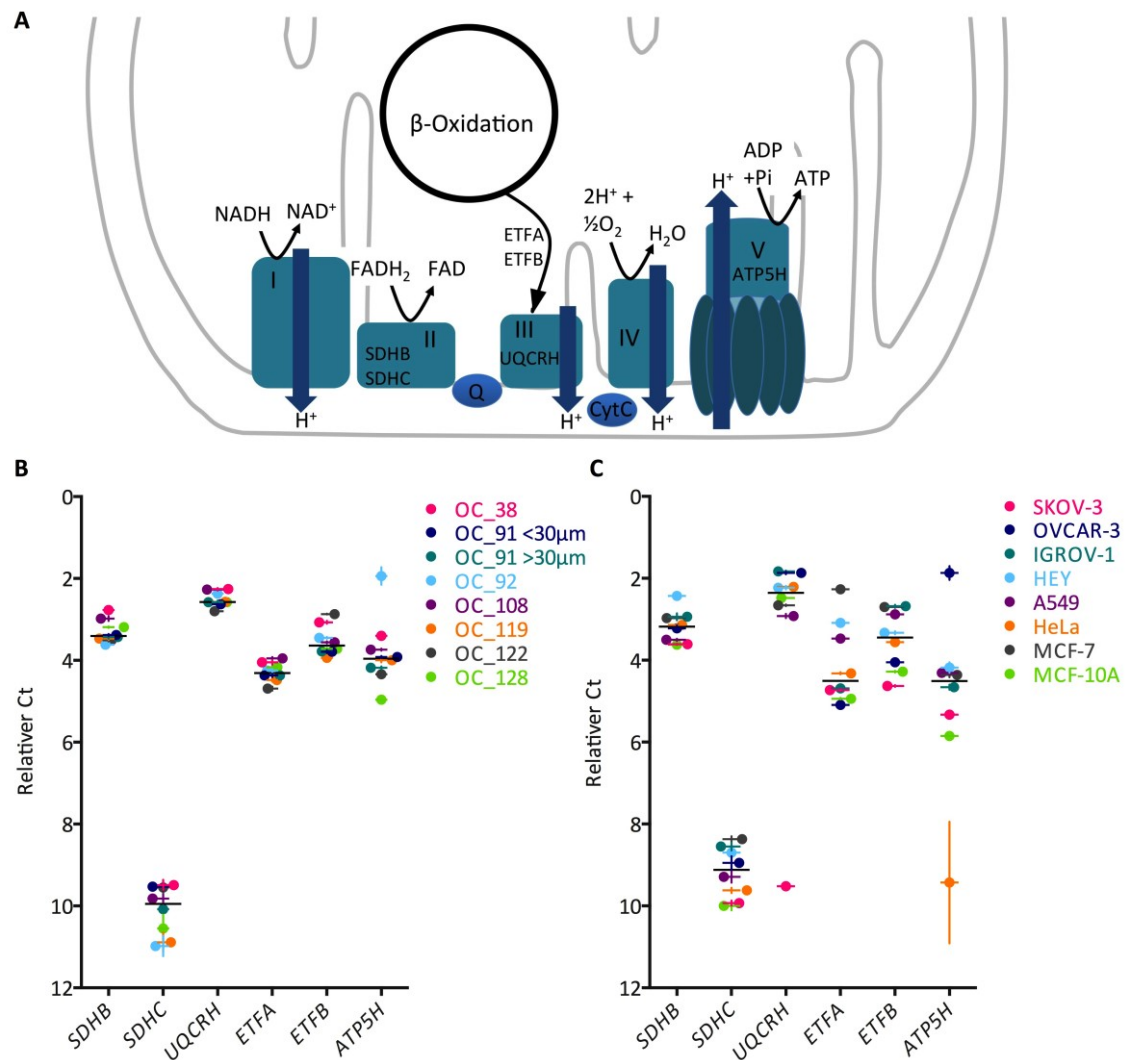


Abbildung 6.4. Expression metabolischer Schlüsselenzyme aus der Atmungskette.

A) Vereinfachte Übersichtsdarstellung der analysierten Gene aus der Atmungskette. **B)** und **C)** Dargestellt ist der durchschnittliche, relative Ct aus Triplikaten verschiedener Gene aus der Atmungskette bezogen auf den Ct des Haushaltsgens *RPL27* in OC-Zellen (**B**) und etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A (**C**), die mittels RT-qPCR ermittelt wurde. Horizontale Striche kennzeichnen den Median des Expressionslevels innerhalb der untersuchten Gruppen.

6.2 Metabolische Charakterisierung von OC-Zellen, etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A

Nachdem die Untersuchung der Expression diverser Metabolismus-assoziierter Schlüsselenzyme keine Rückschlüsse auf präferenziell genutzte Stoffwechselwege zulässt, sollte mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers eine metabolische Charakterisierung der verschiedenen Zelllinien stattfinden.

Um hierzu genauere Informationen zu erhalten, sind verschiedene Ansätze denkbar. Zum einen kann die Nutzung verschiedener Substrate in den unterschiedlichen Zelllinien getestet werden. Darüber hinaus kann die Bedeutung der einzelnen Stoffwechselwege für die unterschiedlichen Zelllinien auch mit Hilfe von Inhibitoren überprüft werden. Außerdem ist es möglich, durch die Injektion verschiedener Inhibitoren Parameter im Bereich der mitochondrialen Respiration und glykolytischen Funktion zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf alle beschriebenen Ansätze zurückgegriffen. Die genauer untersuchten Stoffwechselwege sind in der Übersichtsabbildung (Abbildung 6.5.) dargestellt. Dabei wurde einerseits die Nutzung der Substrate Glukose, Glutamin und Pyruvat untersucht, um einen Überblick über die Relevanz von Glykolyse und Glutaminolyse zu erhalten, andererseits wurden auch verschiedene Inhibitoren zu diesem Zweck genutzt. Dabei sollte mit Hilfe von Oxamat und DCA die Bedeutung der Glykolyse analysiert werden. Etomoxir diente dazu, die Verwendung endogener Fettreserven zu ermitteln und mit Hilfe von SB204990 und AOA sollte überprüft werden, inwiefern die Verwendung der Shuttlesysteme Citrat-Malat-Shuttle und Malat-Aspartat-Shuttle für die unterschiedlichen Zelllinien von Bedeutung ist. Nachfolgend werden immer die OC-Zellen im Vergleich zu etablierten Tumorzellen und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A untersucht.

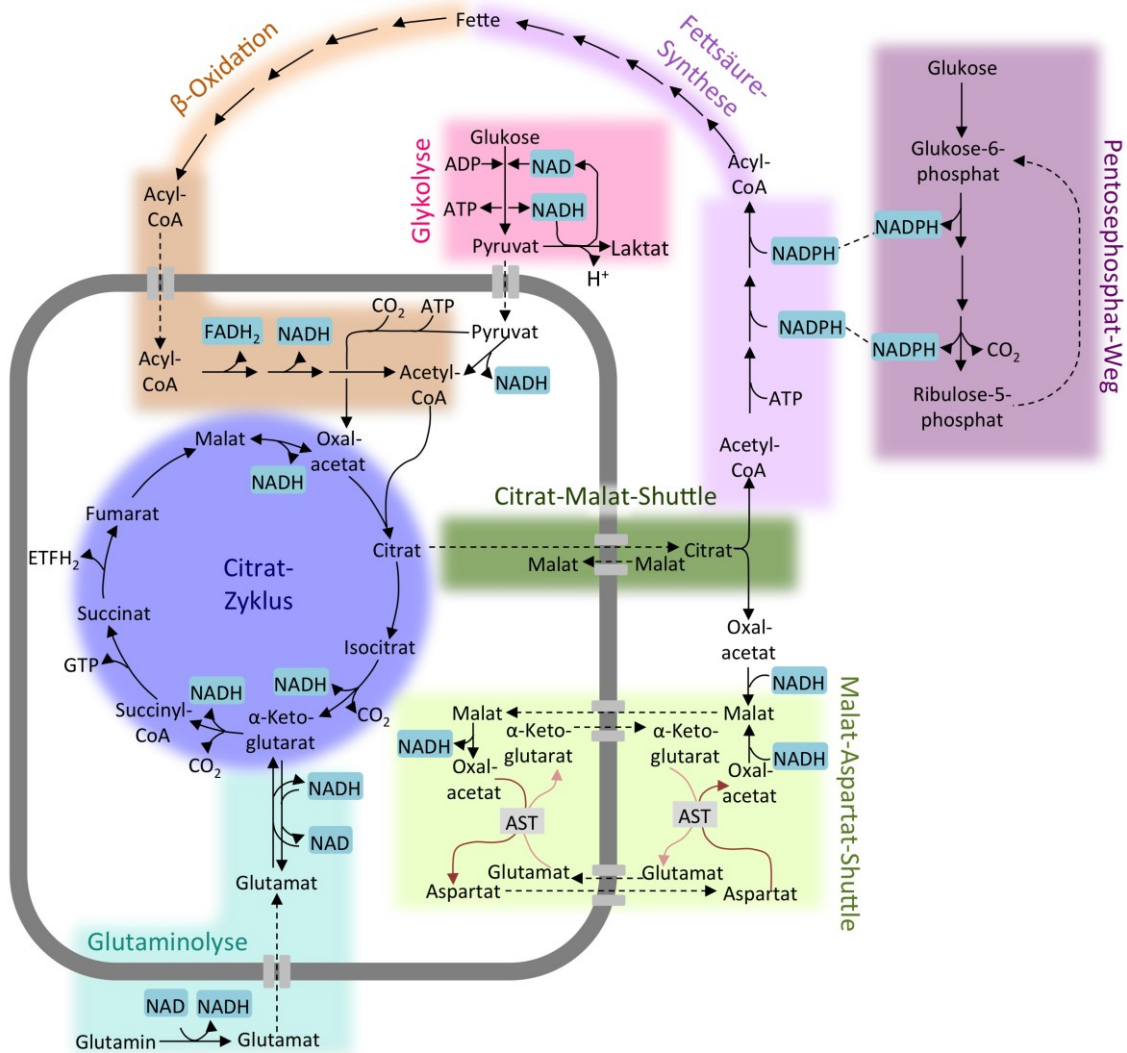


Abbildung 6.5. Übersichtsabbildung aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stoffwechselwege.
(nach einem Entwurf von PD. Dr. Wolfgang Meißner)

6.2.1 Vergleichende Untersuchung der präferentiellen Substratnutzung

Um die Zellen metabolisch zu charakterisieren, ist es erforderlich zu untersuchen, inwiefern unterschiedliche Substrate genutzt werden. Dazu werden mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers die Parameter Sauerstoffverbrauch (OCR) und Laktatbildung (ECAR) der unterschiedlichen Zelllinien bestimmt (vgl. 5.2.3.1.). Nach der Messung dieser Parameter im Mangelmedium KHB, ohne exogen zugefügte Substrate werden die zu testenden Substrate injiziert und die OCR und ECAR 18 min nach Injektion, im Vergleich zur Injektion von KHB, bestimmt (Abbildung 6.6 und Abbildung 6.7). Eine Veränderung der Parameter wird als biologisch relevant angesehen, wenn eine Änderung um mindestens 20 % stattfindet. Bei der Untersuchung der OC-Zellen (Abbildung 6.6.) zeigt sich durch die Injektion von Glukose eine deutliche Reduktion

der OCR, während die ECAR unterschiedlich stark, aber in allen Zelllinien deutlich steigt. Bezüglich der Substrate Glutamin und Pyruvat treten unterschiedliche Effekte auf. Dabei sind die OC_122 Zellen die einzigen unter den getesteten, die Glutamin unter Sauerstoffverbrauch verstoffwechseln, wohingegen Pyruvat von OC_38 und OC_122 Zellen unter Sauerstoffverbrauch metabolisiert wird. Um innerhalb der Gruppe der untersuchten OC-Zellen nur stabile Effekte zu identifizieren und zu analysieren, können diese als biologische Replikate betrachtet und damit zusammengefasst werden. Nach dieser Analyse zeigt sich, dass der Effekt, den Glukose sowohl auf die OCR als auch auf die ECAR hat, extrem signifikant ist ($p < 0,0001$). Auch der Pyruvat-bedingte Anstieg der OCR ist sehr signifikant ($p < 0,01$), während der Anstieg der ECAR durch Pyruvat nicht signifikant ist. Auch die Injektion von Glutamin führt zu keiner signifikanten Änderung von OCR und ECAR.

Bei dieser Untersuchung wurden die übrigen etablierten Tumorzelllinien ebenfalls analysiert, um nach einem geeigneten Modellsystem für gezeigte Effekte zu suchen. Als Kontrolle wurde auch hier die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A mitgeführt (Abbildung 6.7). Die Injektion von Glukose führt in allen getesteten Zelllinien zu einem starken Anstieg der ECAR, der etwa zwischen 200 und 900% der basalen ECAR ohne exogen zugeführte Glukose liegt. Jedoch ist der Effekt des OCR-Abfalls nur in den Zellen SKOV-3, IGROV-1, HEY, A549 und HeLa zu sehen. Die Zellen OVCAR-3, MCF-7 und MCF-10A zeigen keine Reduktion der OCR durch Glukoseinjektion. Zur Nutzung von Glutamin und auch Pyruvat unter Sauerstoffverbrauch sind nur zwei der Ovarialkarzinomzelllinien, nämlich SKOV-3 und OVCAR-3, in der Lage.

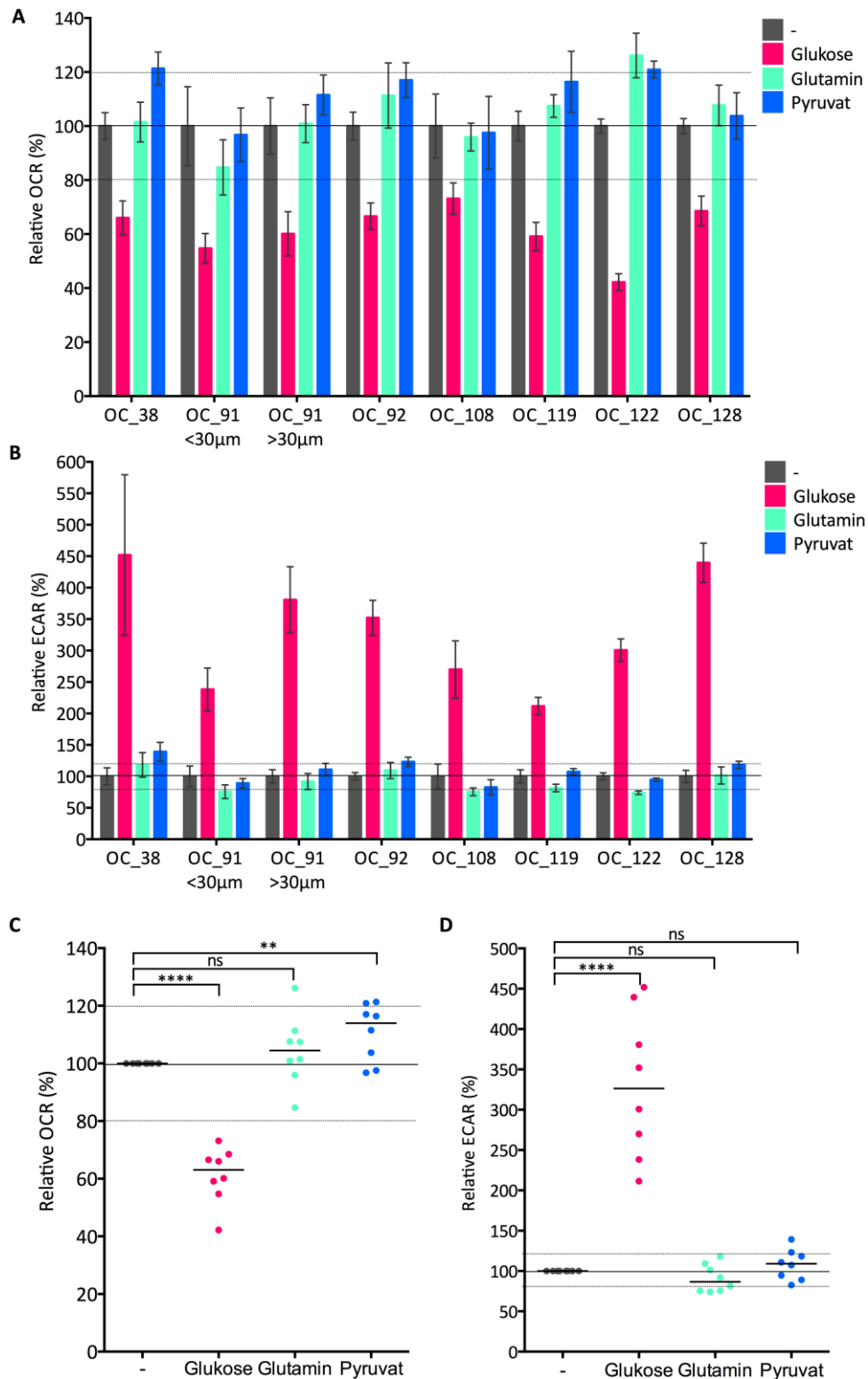


Abbildung 6.6. Nutzung der unterschiedlichen Substrate Glukose, Glutamin und Pyruvat in OC-Zellen.

In KHB wird nach der Injektion verschiedener Substrate (10 mM Glukose, 2 mM Glutamin oder 2 mM Pyruvat) im Vergleich zu „-“, was die Injektion von KHB darstellt, die relative OCR (**A**) und ECAR (**B**) 18 min nach Injektion mit dem Seahorse XFe Analyzer ermittelt. Ein Effekt wird als biologisch relevant angesehen, wenn eine Änderung um mindestens 20 % stattfindet. Aus diesem Grund sind diese Grenzwerte mit einer dünnen Linie gekennzeichnet. **C** und **D**) Die unterschiedlichen OC-Zellen werden als biologische Replikate zusammengefasst und die OCR (**C**) und ECAR (**D**) unter Berechnung der Signifikanz der Effekte dargestellt (t-Test). Horizontale Striche geben den Median der Replikate an. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns=nicht signifikant

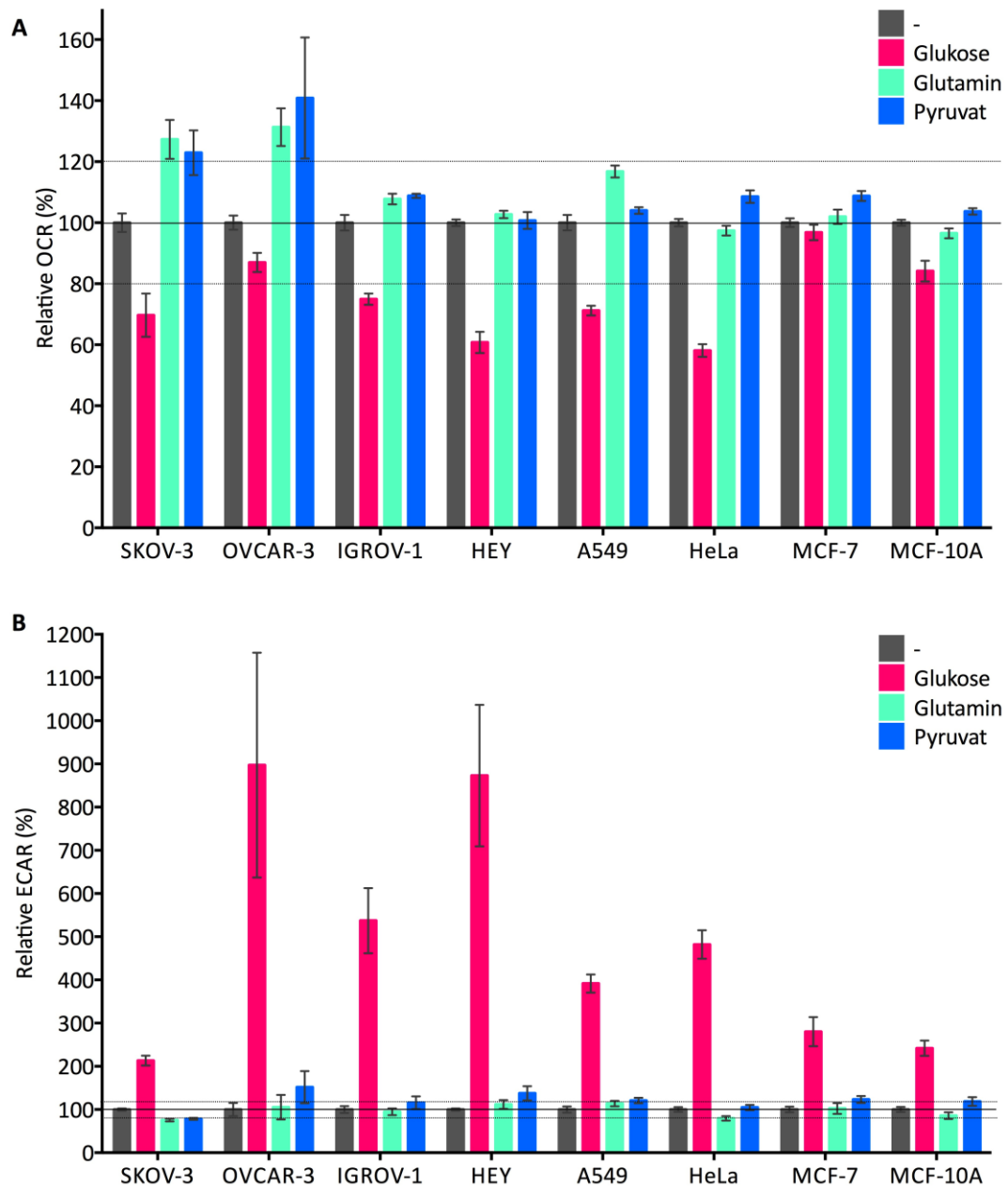


Abbildung 6.7. Nutzung der unterschiedlichen Substrate Glukose, Glutamin und Pyruvat in etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A

In KHB wird nach der Injektion verschiedener Substrate (10 mM Glukose, 2 mM Glutamin oder 2 mM Pyruvat) im Vergleich zu „-“, was die Injektion von KHB darstellt, die relative OCR (**A**) und ECAR (**B**) 18 min nach Injektion mit dem Seahorse XFe Analyzer ermittelt. Ein Effekt wird als biologisch relevant angesehen, wenn eine Änderung um mindestens 20 % stattfindet. Aus diesem Grund sind diese Grenzwerte mit einer dünnen Linie gekennzeichnet.

6.2.2 Vergleichende Untersuchung der mitochondrialen Respiration und der glykolytischen Funktion

Wie bereits eingangs erwähnt, ist es durch die Injektion verschiedener Inhibitoren möglich, verschiedene Parameter der mitochondrialen Funktion mit Hilfe des „Mito-Stress-Tests“ im Seahorse XFe Analyzer zu bestimmen. Die Parameter, die im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich von Bedeutung sind, sind die basale Respiration, die ATP-gekoppelte Respiration, maximale Respiration und die nicht-mitochondriale Respiration (vgl. 5.2.3.1.4.).

Die basale Respiration gibt an, wie viel Sauerstoff die verschiedenen Zellen bei Vorhandensein von Glutamin und Glukose verbrauchen, ohne dass sie an der Nutzung einzelner Stoffwechselwege gehindert werden. Bei der Betrachtung der basalen OCR in den OC-Zellen zeigt sich ein sehr heterogenes Bild (Abbildung 6.8. A). Während die Zelllinien OC_38 und OC_122 eine vergleichsweise geringe basale Respiration von unter 100 pmol O₂/min aufweisen, zeigen die Zelllinien OC_91 <30µm, OC_91 >30µm und OC_92 eine sehr hohe basale Respiration von über 300 pmol O₂/min. Auch die Zelllinie OC_128 weist mit 230 pmol O₂/min eine relativ hohe basale Respiration auf.

Weiterhin wurden die Parameter ATP-gekoppelte und maximale Respiration gemessen (Abbildung 6.8. B). Die ATP-gekoppelte Respiration gibt dabei an, wie viel Sauerstoff zur Generierung von ATP verwendet wird und wird bestimmt durch die Injektion von Oligomycin. Oligomycin inhibiert die ATP-Synthase der Atmungskette, indem es ihren Protonenkanal, der für die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP notwendig ist, blockiert (vgl. 5.2.3.1.4.). Trotz der sehr unterschiedlichen basalen Respiration innerhalb der Gruppe der OC-Zellen ist der Anteil der ATP-gekoppelten Respiration sehr ähnlich und liegt bei 60 bis 70% der basalen Respiration.

Die Injektion von FCCP führt zur maximalen Respiration (vgl. 5.2.3.1.4.). Die maximale Respiration der untersuchten Zelllinien ist erneut sehr heterogen. Dabei fällt auf, dass die Zelllinien, die bereits eine hohe basale Respiration zeigen (OC_91 <30µm, OC_91 >30µm, OC_92 und OC_128), mit dieser bereits am Maximum angekommen sind, während die Zelllinien, die eine vergleichsweise niedrige basale Respiration aufweisen (OC_38, OC_108, OC119, OC_122) diese durch die Injektion von FCCP noch deutlich steigern können. Das heißt diese Zellen verfügen über eine hohe respiratorische Reservekapazität.

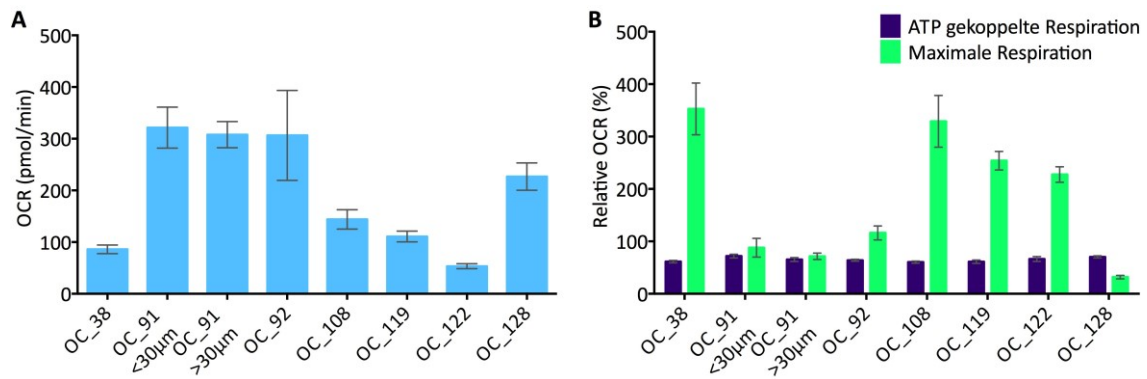


Abbildung 6.8. Ermittlung der mitochondrialen Respiration in OC-Zellen mit dem Seahorse XFe Analyzer.

A) Die basale Respiration wird in *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin und 25 mM Glukose ermittelt. **B)** Durch die Injektion von 2 µM Oligomycin kann die relative ATP-gekoppelte Respiration als Differenz aus basaler OCR zu OCR nach Oligomycin-Injektion relativ zur basalen OCR berechnet werden. Die maximale mitochondriale Respiration wird ebenfalls relativ zur basalen Respiration berechnet. Diese ergibt sich aus der Differenz der OCR nach FCCP Injektion und der OCR nach Injektion der Inhibitoren von Komplex III (AntimycinA) und Komplex I (Rotenone) der Atmungskette, was die nicht-mitochondriale Respiration angibt.

Auch bei dieser Untersuchung erfolgt der Vergleich zu bereits etablierten Zelllinien (Abbildung 6.9.). Auch hier ist die basale OCR sehr unterschiedlich und reicht von 80 bei HEY bis knapp 200 pmol/min bei HeLa. Unabhängig von der basalen Respiration liegt auch hier die ATP-gekoppelte Respiration einheitlich zwischen 60 und 70% der basalen OCR. Die maximale Respiration hingegen schwankt stark. Während HEY Zellen bereits mit der basalen Respiration am Maximum ihrer Kapazität angekommen sind, weisen MCF-10A eine respiratorische Reserve von über dem dreifachen der basalen Respiration auf.

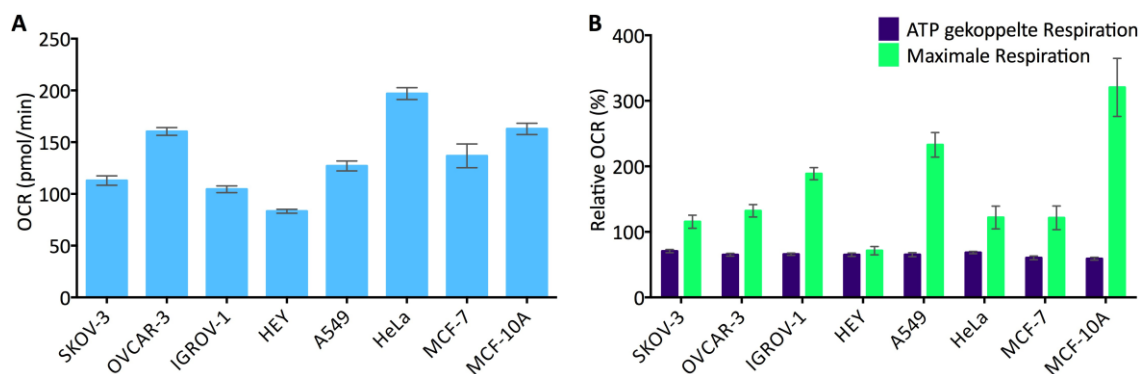


Abbildung 6.9. Ermittlung der mitochondrialen Respiration in etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A mit dem Seahorse XFe Analyzer.

A) Die basale Respiration wird in *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin und 25 mM Glukose ermittelt. **B)** Durch die Injektion von 2 µM Oligomycin kann die relative ATP-gekoppelte Respiration als Differenz aus basaler OCR zu OCR nach Oligomycin-Injektion relativ zur basalen OCR berechnet werden. Die maximale mitochondriale Respiration wird ebenfalls relativ zur basalen Respiration berechnet. Diese ergibt sich aus der Differenz der OCR nach FCCP Injektion und der OCR nach Injektion der Inhibitoren von Komplex III (AntimycinA) und Komplex I (Rotenone) der Atmungskette, was die nicht-mitochondriale Respiration angibt.

Ein weiterer standardmäßig verwendeter Test ist der „Glyko-Stress-Test“, der die Messung der Glukosenutzung unter verschiedenen Bedingungen und die Bestimmung der Parameter: glykolytische Kapazität, glykolytische Reserve und nicht-glykolytische Azidifizierung erlaubt (vgl. 5.2.3.1.5.).

Die Bestimmung dieser Parameter erfolgte für die OC-Zellen im Vergleich zu etablierten Tumorzelllinien und der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A.

Die basale ECAR ohne Zugabe externer Glukose innerhalb der patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen (Abbildung 6.10.) schwankt zwischen 11 (OC_122) und 70 mpH/min (OC91 >30µm). Außerdem fällt auf, dass die Zelllinien, die bereits eine hohe basale Atmung gezeigt haben, auch eine hohe basale Glykolyse aufweisen. Die Rate der relativen extrazellulären Azidifizierung nach Glukoseinjektion steigt bei OC_92 um 68 % und bei OC_122 um 125 % über den Basalwert ohne externe Glukose an und liegt damit relativ eng zusammen. Die Werte der glykolytischen Kapazität (nach Oligomycin-Injektion) befinden sich im Bereich von 150 bis 270 % Anstieg in Relation zur basalen ECAR.

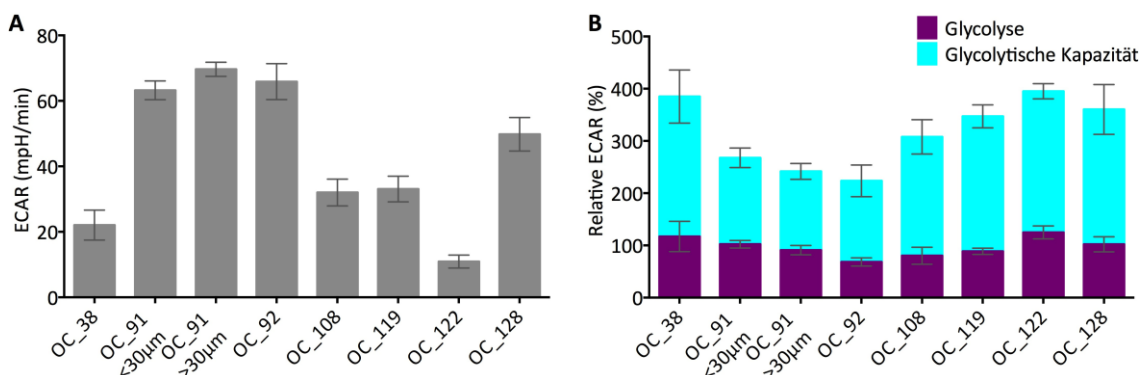


Abbildung 6.10. Ermittlung der glykolytischen Funktion von OC-Zellen mit dem Seahorse XFe Analyzer. **A)** Die basale ECAR ohne Zugabe von externer Glukose wird im *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin bestimmt. **B)** Die Glykolyse nach Glukose-Injektion und die glykolytische Kapazität (vgl. 5.2.3.1.5.) werden relativ zur basalen ECAR ohne Zugabe externer Glukose dargestellt.

Bezüglich der etablierten Tumorzelllinien zeigt sich im Gegensatz zur basalen ECAR der OC-Zellen ein eher einheitliches Bild und bewegt sich im Bereich von 15-28 mpH/min (Abbildung 6.11.). Der Anstieg der ECAR nach Glukoseinjektion ist jedoch stark unterschiedlich. Während bei den SKOV-3 Zellen der Anstieg der extrazellulären Azidifizierungsrate nur 36 % beträgt, steigt die relative ECAR der übrigen Ovarialkarzinomzelllinien um 350 bis 430 % an. Trotz der hohen Glykolyserate nach Glukoseinjektion besitzen sie ebenfalls auch die höchste glykolytische Kapazität mit über 700 % im Vergleich zur basalen ECAR ohne Glukoseinjektion, während die maximale glykolytische Kapazität der übrigen Zelllinien zwischen 300 und 400 %

ansteigt. Auch SKOV-3 Zellen weisen im Gegensatz zu den übrigen Ovarialkarzinomzelllinien nur eine geringe glykolytische Kapazität auf.

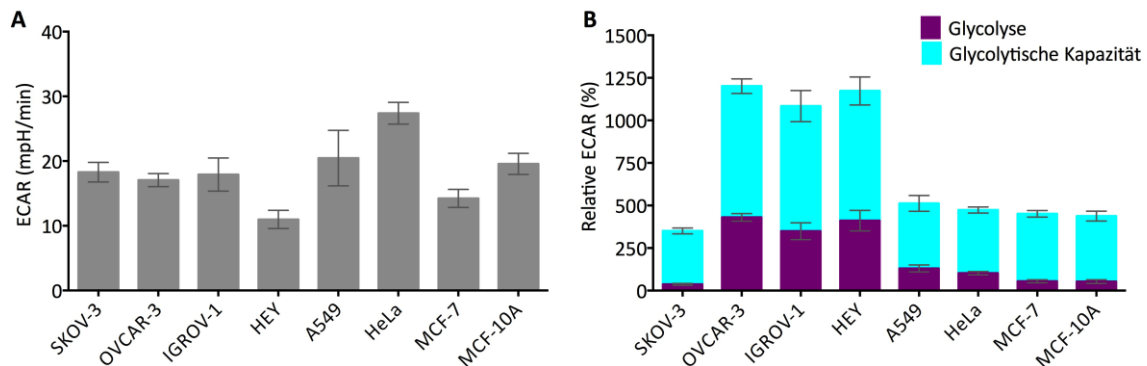


Abbildung 6.11. Ermittlung der glykolytischen Funktion von etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A mit dem Seahorse XFe Analyzer.

A) Die basale ECAR ohne Zugabe von externer Glukose wird im *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin bestimmt. **B)** Die Glykolyse nach Glukose-Injektion und die glykolytische Kapazität (vgl. 5.2.3.1.5.) werden relativ zur basalen ECAR ohne Zugabe externer Glukose dargestellt.

6.2.3 Vergleichende Untersuchung der Nutzung verschiedener Stoffwechselwege unter Inhibitor-Einwirkung

Die Untersuchung des Metabolismus der OC-Zellen und der etablierten Zelllinien unter „Normalbedingungen“ lässt keine Rückschlüsse auf ihre präferenziell genutzten Substrate zu. Bezüglich der Fragestellung dieser Arbeit kann man deshalb daraus auch nicht ableiten, wie Zellen manipuliert werden müssen, um sie in ihrer Proliferation beeinträchtigen zu können. Die Zellen weisen zwar individuelle Unterschiede auf, jedoch scheinen unter diesen Bedingungen beide zur ATP-Gewinnung geeigneten Prozesse, also mitochondriale Respiration und Glykolyse, abzulaufen.

Aus diesem Grund wurde sich nach der Klärung der Frage „Was machen die Zellen unter Normalbedingungen?“ mit der Frage „Was können die Zellen?“ beschäftigt. Dieser experimentelle Ansatz sieht die Manipulation verschiedener Stoffwechselwege und den Entzug unterschiedlicher Substrate vor. Dabei soll untersucht werden, inwiefern Zellen auf die Blockade einzelner Stoffwechselwege reagieren, sowohl metabolisch durch das Ausweichen auf andere Stoffwechselwege als auch auf Ebene der Proliferation.

6.2.3.1 Inhibition der PDKs durch DCA und dessen Einfluss auf Metabolismus und Proliferation

Einer der meist diskutierten metabolischen Besonderheiten von Tumorzellen ist der Warburg-Effekt, bei dem die Zellen trotz der Anwesenheit von Sauerstoff das in der Glykolyse entstandene Pyruvat nicht zur ATP-Generierung mittels OXPHOS nutzen, sondern Laktat bilden (vgl. 4.1.). Um dem entgegenzuwirken, wurde DCA, ein Inhibitor der PDKs, verwendet und dadurch indirekt die PDH aktiviert (vgl. 4.4.1.). Somit sollte der Einsatz von DCA die Zellen weg von der aeroben Glykolyse hin zur OXPHOS umleiten (Abbildung 6.12.). DCA gilt in der Krebstherapie als vielversprechendes Medikament, weshalb auch seine Wirkung, sowohl was Metabolismus als auch Proliferation betrifft, für die primären, patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen untersucht werden sollten.

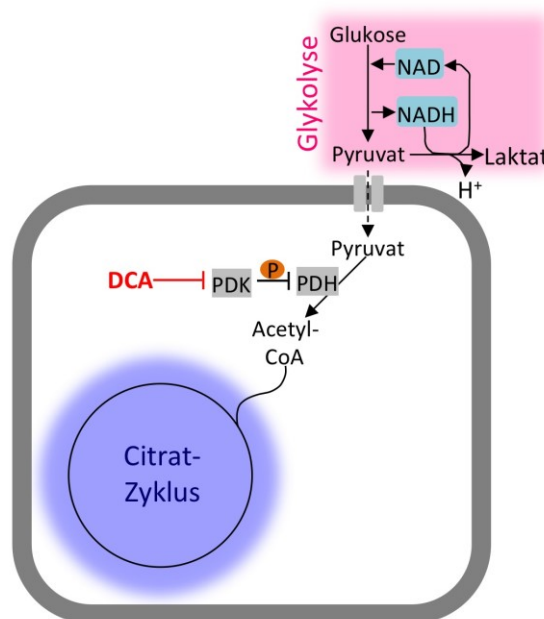


Abbildung 6.12. Übersichtsabbildung über die Wirkung von DCA.

DCA hemmt die PDKs, welche die PDH inhibitorisch phosphorylieren. Demnach ist durch DCA-Behandlung die Aktivität der PDH gesteigert.

Zunächst sollte überprüft werden, ob DCA auf alle getesteten Zelllinien auf molekularer Ebene den beschriebenen Effekt hat, also ob durch die Einwirkung von DCA die Phosphorylierung der PDH abnimmt. Dazu wurden die Zellen mit 40 mM DCA behandelt und anschließend sowohl Gesamt-PDH als auch deren Phosphorylierungsstatus mit Hilfe des Bio-Plex MAGPIX Multiplex Readers bestimmt (siehe 5.2.3.3.). Die Inkubation von DCA erfolgte für 10 min, um eine Vergleichbarkeit mit den Experimenten im Seahorse XFe Analyzer zu ermöglichen.

Durch die Messung von Gesamt-PDH soll sichergestellt werden, dass sich die PDH-Mengen innerhalb der unterschiedlichen Bedingungen einer Zelllinie nicht wesentlich unterscheiden,

um dann eine relative Phosphorylierung an den drei verschiedenen Serin-Resten pS232, pS293 und pS300 vergleichen zu können. Die Messung der Gesamt-PDH-Menge weist innerhalb des jeweiligen Probenpaares keinen bedeutenden Unterschied auf, sodass auf die Gesamtmenge als Normalisierung der Phosphorylierungen der unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen zurückgegriffen werden konnte (Abbildung 6.13. A und C).

Die relative Phosphorylierung zeigt in allen Zellen eine Abnahme der Phosphorylierung, vor allem von pS232 und pS300. Auffallend ist dabei auch, dass die Zelllinien OVCAR-3 und MCF-7 bereits in der Kontrollprobe ohne DCA eine starke Dephosphorylierung der PDH aufweisen. Weiterhin ist anzumerken, dass die DCA-abhängige Dephosphorylierung in HEY-Zellen nur sehr schwach vorhanden ist (Abbildung 6.13. B und D).

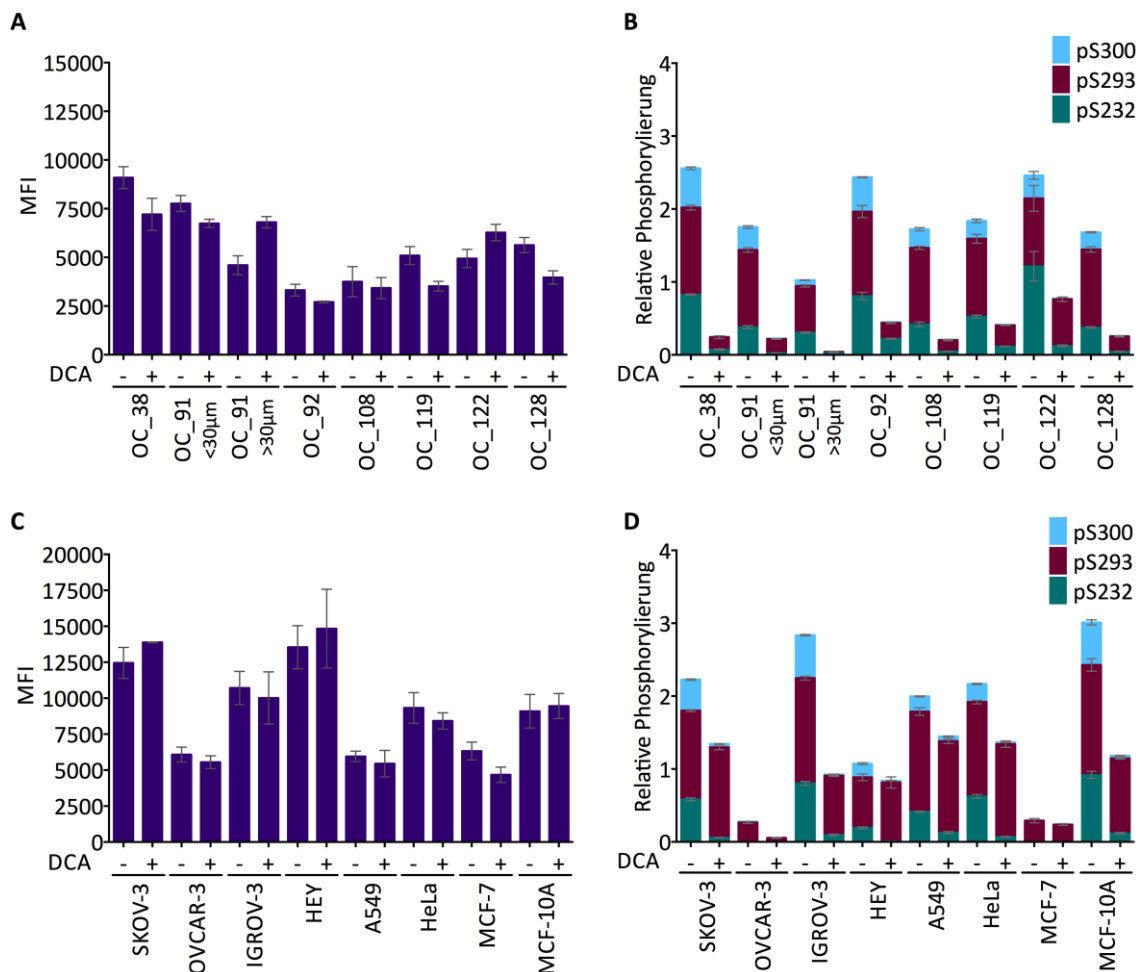


Abbildung 6.13. Nachweis der Dephosphorylierung der PDH durch DCA-Behandlung.

Die Zellen wurden für 10 Minuten mit 40 mM DCA behandelt und anschließend der Phosphorylierungszustand der drei Phosphorylierungsstellen S232, S293 und S300 der PDH in OC-Zellen (A und B) und etablierten Tumorzelllinien (C und D) untersucht. Dabei werden mit Hilfe des Bio-Plex MAGPIX Multiplex Readers (vgl. 5.2.3.3.) sowohl Gesamt-PDH gemessen (A und C) und in MFI ("mean fluorescence intensity") angegeben als auch die relative Phosphorylierung der unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen bezogen auf die Gesamt-PDH-Menge (B und D) bestimmt.

Außerdem wurde mit Hilfe der SKOV-3 Zellen exemplarisch getestet, wie stabil der DCA-Effekt bezüglich der Dephosphorylierung der PDH ist. Dazu wurden die Zellen für 1,5; 5 und 24 Stunden mit DCA inkubiert und erneut sowohl Gesamt-PDH als auch der Phosphorylierungszustand an den einzelnen Phosphorylierungsstellen untersucht (Abbildung 6.14.). Die Messung zeigt, dass sich die Gesamt-PDH-Menge zwischen den einzelnen Proben nicht voneinander unterscheidet, während Phosphorylierung über die Zeit noch weiter abnimmt und auch nach 24 h noch stabil bleibt.

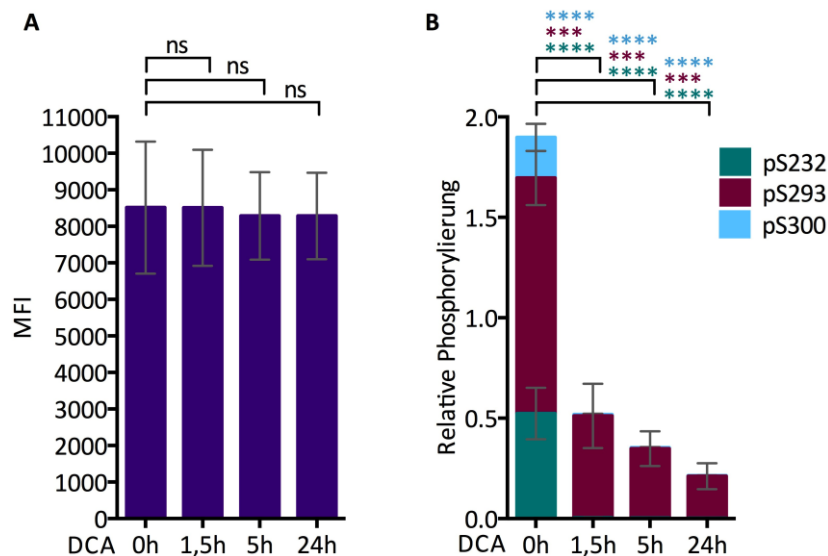


Abbildung 6.14. Nachweis der verstärkten Dephosphorylierung der PDH durch längerfristige DCA-Behandlung in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3.

Die Zellen wurden für 1,5; 5 und 24 Stunden mit 40 mM DCA behandelt und anschließend sowohl Gesamt-PDH (A) als auch der Phosphorylierungszustand der drei Phosphorylierungsstellen S232, S293 und S300 (B) mit Hilfe des Bio-Plex MAGPIX Multiplex Readers gemessen und die Phosphorylierung der unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen bezogen auf die Gesamt-PDH-Menge berechnet. Die Balken stellen den Mittelwert aus 5 biologischen Replikaten, jeweils gemessen in technischen Triplikaten dar, deren Signifikanz mittels t-Test berechnet wurde. ****p<0,0001, ns=nicht signifikant

Nachdem die molekulare Wirkung von DCA sichergestellt wurde, sollte nun der Effekt des Inhibitors auf metabolischer Ebene untersucht werden. Der Theorie nach müsste durch die Behandlung mit DCA die OCR ansteigen, während die ECAR abfällt, was durch die verstärkte Aktivität der PDH aufgrund deren verminderter inhibitorischer Phosphorylierung zu erklären ist. Für die Untersuchung wurden die Zellen in KHB mit 25 mM Glukose überführt und OCR und ECAR der Zellen mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers bestimmt. Dieses Medium wurde gewählt, damit für die Zellen nur die Metabolisierung der Glukose möglich ist und nicht auf andere Stoffwechselwege ausgewichen werden kann. Nach der initialen Messung der basalen Parameter wurde DCA injiziert und OCR und ECAR relativ zu den basalen Parametern zu einem frühen (6 min nach Injektion) und einem späten (36 min nach Injektion) Zeitpunkt bestimmt. Bei der Untersuchung der OC-Zellen zeigt sich tatsächlich zum frühen Zeitpunkt ein Anstieg der

OCR und ein Abfallen der ECAR (Abbildung 6.15.). Betrachtet man diese Parameter allerdings 30 min später (spät), so fällt auf, dass sie sich wieder an den Ausgangswert angleichen.

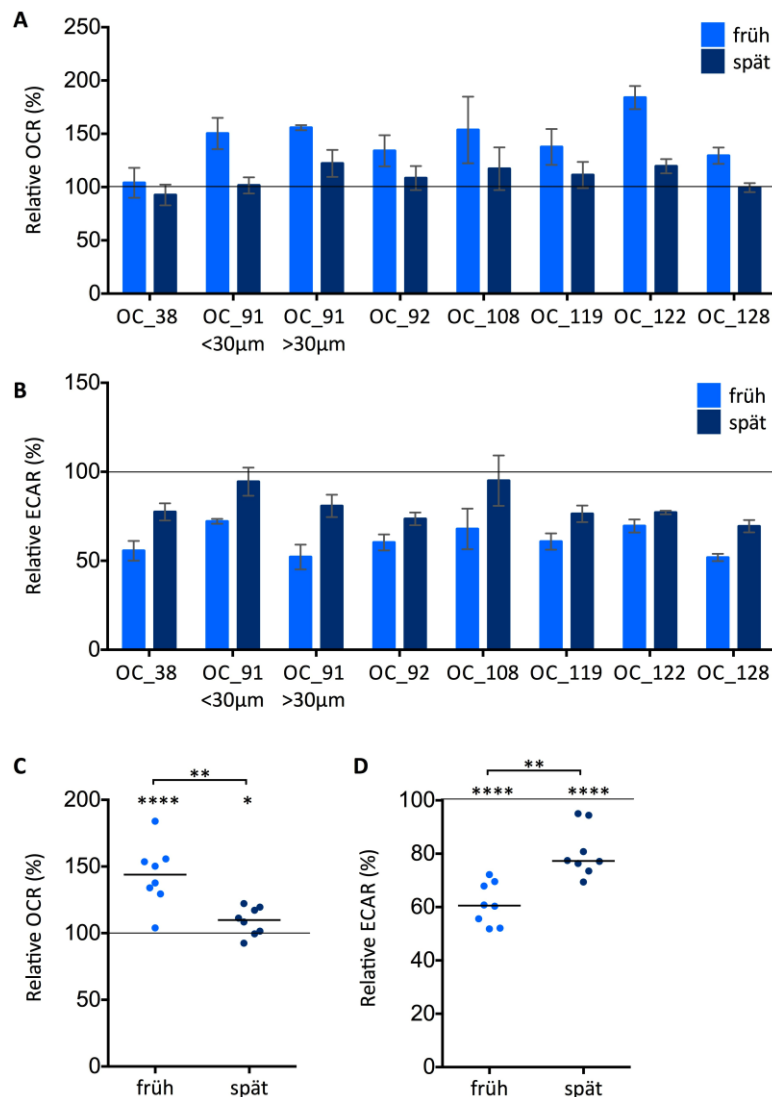


Abbildung 6.15. Metabolische Auswirkung von DCA-Gabe auf OC-Zellen.

In KHB mit 25 mM Glukose werden 40 mM DCA injiziert und die metabolische Auswirkung auf OCR **(A)** und ECAR **(B)** zu einem frühen (6 min) und einem späten (36 min) Zeitpunkt mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Die Änderungen werden relativ zu den basalen Werten vor Injektion von DCA berechnet. **(C)** und **(D)** Die unterschiedlichen patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen werden als biologische Replikate zusammengefasst und die OCR **(C)** und ECAR **(D)** unter Berechnung der Signifikanz der Effekte dargestellt (t-Test). Horizontale Striche geben den Median der Replikate an. ****p<0,0001, **p<0,01, *p<0,05

Um nur stabile Effekte zu analysieren, wurden die Zelllinien dieser Gruppe als biologische Replikate betrachtet und zusammengefasst. Dabei zeigt sich, dass die Wirkung von DCA sowohl zum frühen als auch zum späten Zeitpunkt einen signifikanten Anstieg der OCR zur Folge hat, jedoch die Differenz zwischen den beiden gemessenen Zeitpunkten ebenfalls

signifikant ist. Ebenso zeigt sich durch DCA-Gabe wie erwartet eine signifikante Abnahme der ECAR zu beiden Zeitpunkten, die sich jedoch auch signifikant voneinander unterscheiden.

Zusätzlich zur metabolischen Auswirkung der DCA-Gabe sollte auch die Auswirkung auf die Proliferation untersucht werden. Dazu wurde der Zellindex, der sich aus der Proliferation ergibt, mit Hilfe des xCELLigence RTCA in Echtzeit erfasst (Tabelle 6.1.). Die Zellen wurden dabei in ihrem jeweiligen Kulturmedium ausgesät und nachdem die Anheftung und Proliferation sichergestellt wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an DCA behandelt. In einem geeigneten Zeitraum wurde die Verdopplungszeit berechnet und diese relativ zur Verdopplungszeit der Kontrollzellen dargestellt. Ein Anstieg der Verdopplungszeit um 20 % ($\geq 1,2$ -fach) wurde als Effekt betrachtet und deshalb farbig gekennzeichnet. Hellorange markierte Felder weisen auf eine nur kurzfristige Wachstumsverzögerung hin, während dunkelorange markierte Felder eine dauerhafte Proliferationsinhibition aufweisen. Ist die Verdopplungszeit der Zellen unter einer bestimmten Behandlung negativ, so wird diese mit einem „-“ gekennzeichnet und bedeutet eine Abnahme des Zellindex, was gleichbedeutend mit einem Absterben der Zellen ist.

Tabelle 6.1. Proliferationsinhibitorische Auswirkung von DCA-Gabe auf OC-Zellen.

Im Vollmedium werden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM und 20 mM) DCA behandelt und deren Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert. In einem geeigneten Zeitraum wird die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt und diese relativ zur Verdopplungszeit der Kontrollzellen dargestellt. Ein Anstieg der Verdopplungszeit um den Faktor 1,2 (=20 %) wurde als Effekt betrachtet und deshalb farbig gekennzeichnet. Dabei stellen hellorange markierte Felder nur eine kurzfristige Wachstumsverzögerung dar, während dunkelorange markierte Felder eine dauerhafte Proliferationsinhibition über mindestens 4 Tage aufweisen. Ist ein Feld mit einem „-“ gekennzeichnet, so war die Verdopplungszeit dieser Zellen unter dieser Konzentration negativ.

	OC_38	OC_91 <30 μ m	OC_91 >30 μ m	OC_92	OC_108	OC_119	OC_122	OC_128
1 mM DCA	1,05	1,00	1,03	1,18	0,63	1,05	0,97	1,08
2,5 mM DCA	0,99	1,03	0,86	0,96	0,57	1,17	1,01	1,00
5 mM DCA	1,20	0,98	1,40	1,21	0,89	1,46	1,04	0,91
10 mM DCA	1,04	1,04	4,31	1,11	-	1,85	1,33	1,38
20 mM DCA	1,07	1,32	-	-	-	-	4,83	10,63

Obwohl die OC-Zellen metabolisch ähnliche Effekte aufweisen, ist ihre Reaktion der DCA-Gabe auf die Proliferation sehr divers und reicht hier von einer sehr sensitiven Reaktion (OC_91 <30 μ m, OC_119) bis hin zur vollständigen Resistenz bis zu einer Konzentration von 20 mM (OC_38).

Auch bei dieser Untersuchung wurden weitere Zelllinien mitgeführt mit der Absicht, ein geeignetes Modellsystem für die unterschiedlichen Effekte zu finden. Bei der Untersuchung der etablierten Zelllinien zeigt sich in allen ein Absenken der ECAR durch DCA sowohl zum frühen als auch zum späten Zeitpunkt (Abbildung 6.16. B). Der durch eine gesteigerte OXPHOS erhöhte Sauerstoffverbrauch ist jedoch nur in IGROV-1, A549, HeLa und MCF-10A zu erkennen. In SKOV-3 und OVCAR-3 steigt dieser direkt nach der Injektion an, bleibt aber nicht stabil auf gesteigertem Niveau, sondern fällt wieder ab. In den Zelllinien HEY und MCF-7 ist von Anfang an keine Steigerung der OCR zu verzeichnen (Abbildung 6.16. A) .

Bezüglich der Auswirkung der DCA-Gabe auf die Proliferation fällt auf, dass die Zellen, die wie erwartet auf DCA mit einer gesteigerten OCR und einem Abfall der ECAR reagieren (A549, HeLa und MCF10A), erst ab einer Konzentration von 20 mM DCA in ihrer Proliferation beeinträchtigt sind. SKOV-3, OVCAR-3, HEY und MCF-7 zeigen auf metabolischer Ebene nicht den erwarteten DCA-Effekt, weisen aber eine deutliche Proliferationsinhibition durch 10 mM DCA (und geringere Konzentrationen) auf. IGROV-1 reagieren zwar metabolisch wie erwartet auf DCA, zeigen aber trotzdem eine deutliche Proliferationsinhibition.

Unter den getesteten etablierten Zelllinien zeigen SKOV-3 und OVCAR-3 auf metabolischer Ebene eine ähnliche Reaktion auf die Injektion von DCA wie die OC-Zellen, weshalb sie für diese Fragestellung als Modellsystem dienen könnten. Bezüglich des DCA-Effektes auf Ebene der Proliferation ist dies jedoch nicht der Fall. Während SKOV-3 und OVCAR-3 bereits ab 5 mM DCA eine deutliche Proliferationsinhibition aufweisen, zeigt sich unter den primären Tumorzellen, wie schon beschrieben, ein sehr heterogenes Bild.

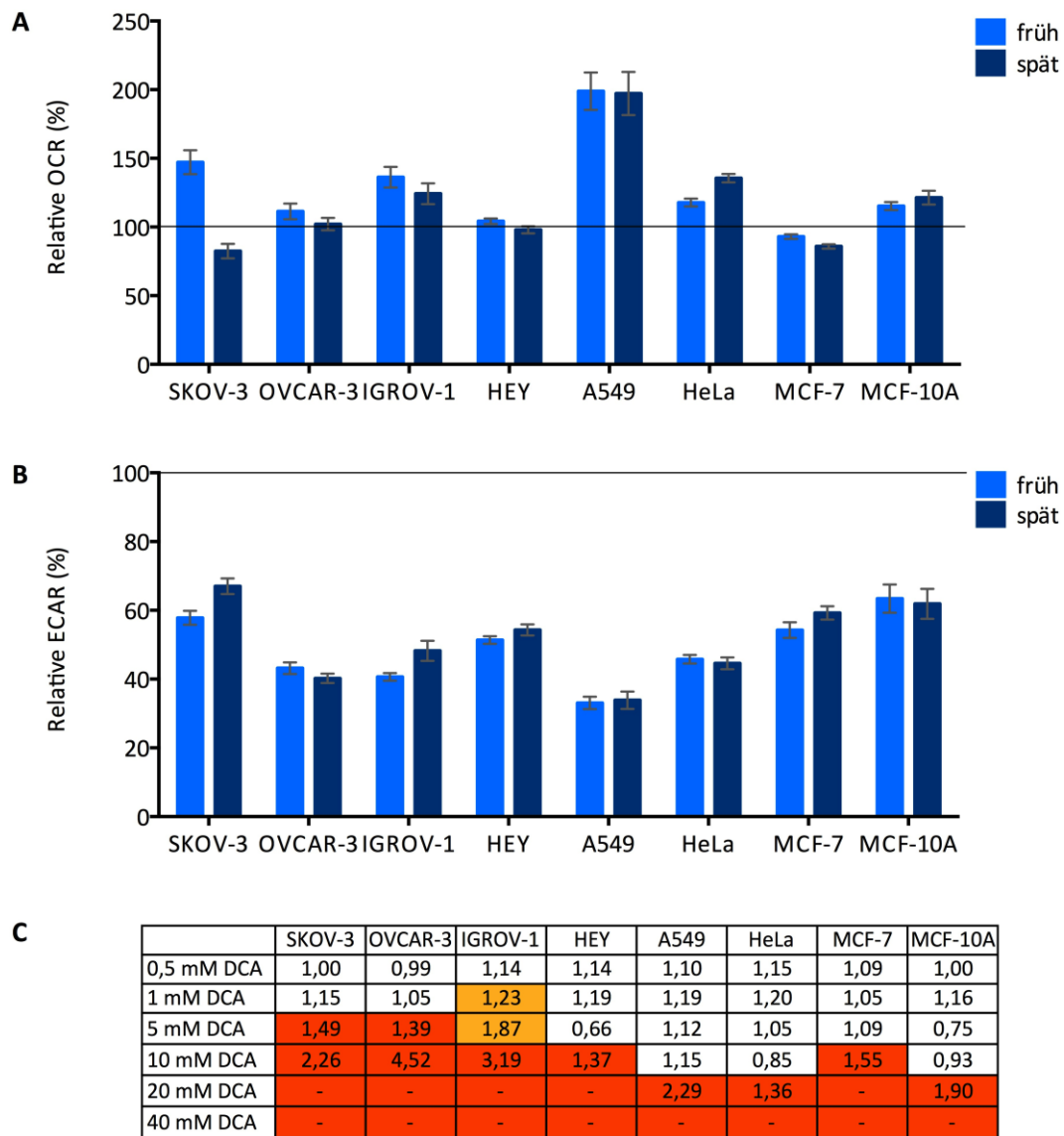


Abbildung 6.16. Metabolische und proliferationsinhibitorische Auswirkung von DCA-Gabe auf etablierte Tumorzelllinien und die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A.

In KHB mit 25 mM Glukose werden 40 mM DCA injiziert und die metabolische Auswirkung auf OCR (**A**) und ECAR (**B**) zu einem frühen (6 min) und einem späten (36 min) Zeitpunkt mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Die Änderungen werden relativ zu den basalen Werten vor Injektion von DCA berechnet. **C**) Im Vollmedium werden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM und 40 mM) DCA behandelt und deren Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert. In einem geeigneten Zeitraum wird die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt und diese relativ zur Verdopplungszeit der Kontrollzellen dargestellt. Ein Anstieg der Verdopplungszeit um den Faktor 1,2 (=20 %) wurde als Effekt betrachtet und deshalb farbig gekennzeichnet. Dabei stellen hellorange markierte Felder nur eine kurzfristige Wachstumsverzögerung dar, während dunkelorange markierte Felder eine dauerhafte Proliferationsinhibition über mindestens 4 Tage aufweisen. Ist ein Feld mit einem „-“ gekennzeichnet, so war die Verdopplungszeit dieser Zellen unter dieser Bedingung negativ.

6.2.3.2 Einfluss des LDH-Inhibitors Oxamat auf Metabolismus und Proliferation

Eine weitere Möglichkeit dem Warburg-Effekt entgegenzuwirken ist, die Laktatproduktion zu vermindern. Dies kann über die Inhibition der LDH durch Oxamat erreicht werden (Abbildung 6.17.).

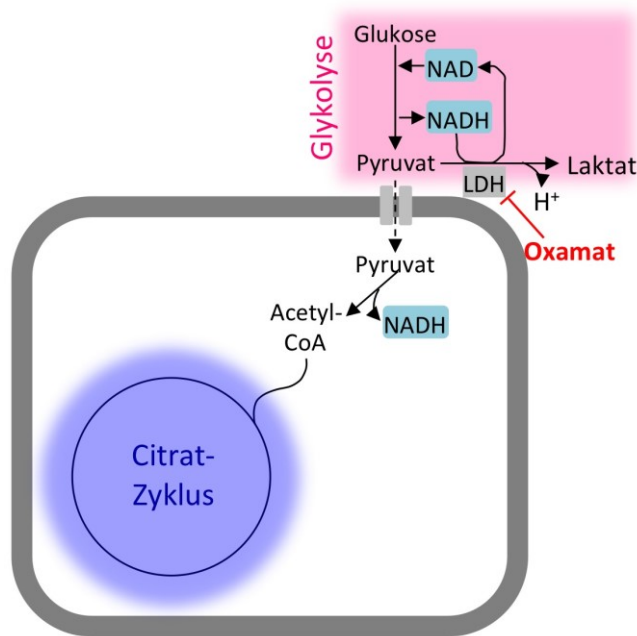


Abbildung 6.17. Übersichtsabbildung über die Wirkung von Oxamat.

Oxamat hemmt die Laktat-Dehydrogenase, welche die Bildung von Laktat aus Pyruvat katalysiert, wobei NADH zu NAD⁺ oxidiert wird und Protonen frei werden.

Durch den Einsatz von Oxamat konnten bereits Antitumoreffekte wie die Verminderung der Laktatproduktion und des Wachstums, sowie eine Resensitivierung auf Chemotherapeutika erzielt werden (vgl. 4.4.2.). Es stellt sich deshalb die Frage, ob Oxamat auch für eine Behandlung von Ovarialkarzinomen als therapeutisches Werkzeug zur Verfügung stehen kann. Zu diesem Zweck werden die OC-Zellen auf ihre metabolische und proliferative Reaktion auf Oxamat untersucht.

Die Untersuchung des Oxamat-Effekts wurde in zwei unterschiedlichen Medien durchgeführt. Zum einen wurde KHB mit 25 mM Glukose verwendet, um die Reaktion der Zellen zu untersuchen, wenn Glukose ihr einziger exogener Energielieferant ist. Zum anderen wurde für das Experiment *low-buffered* DMEM verwendet, ein Medium, in dem die Zellen neben Glukose auch Glutamin und Aminosäuren zur Verfügung haben.

Im Gegensatz zur DCA-Wirkung, die innerhalb der OC-Zellen einheitlich war, weist die Oxamat-Wirkung große Unterschiede auf. Im KHB mit Glukose und auch im *low-buffered* DMEM zeigt sich in allen Zellen eine Reduktion der ECAR durch die Injektion von Oxamat (Abbildung 6.18. A).

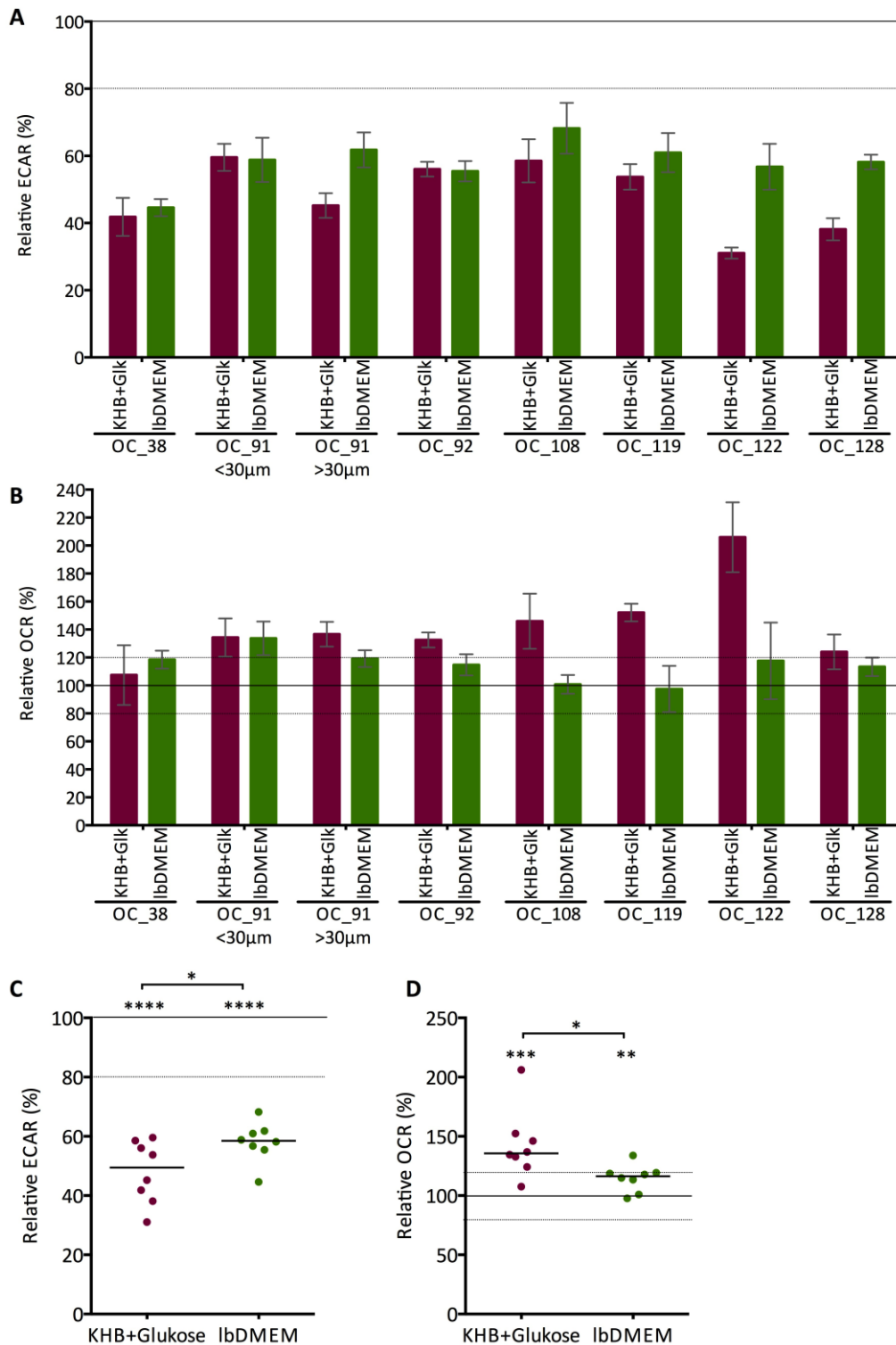


Abbildung 6.18. Metabolische Auswirkung von Oxamat-Gabe auf OC-Zellen.

In KHB mit 25 mM Glukose oder in *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin und 25 mM Glukose werden 50 mM Oxamat injiziert und die metabolische Auswirkung auf ECAR (**A**) und OCR (**B**) 36 min nach Injektion mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Die Änderungen werden relativ zu den basalen Werten vor Injektion von Oxamat berechnet. Ein Effekt wird als biologisch relevant angesehen, wenn eine Änderung um mindestens 20 % stattfindet. Aus diesem Grund sind diese Grenzwerte mit einer dünnen Linie gekennzeichnet. **C**) und **D**) Die unterschiedlichen OC-Zellen werden als biologische Replikate zusammengefasst und die ECAR (**C**) und OCR (**D**) unter Berechnung der Signifikanz der Effekte dargestellt (t-Test). Horizontale Striche geben den Median der Replikate an. ****p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

Dabei stellt sich die Frage, ob die Zellen das durch die Blockade der LDH anfallende Pyruvat zur Energiegewinnung über OXPHOS einsetzen. Im KHB mit Glukose lässt sich in der Tat eine gesteigerte OCR bei allen Zellen, außer der Zelllinie OC_38, erkennen. Im *low-buffered* DMEM zeigt nur die Zelllinie OC_91 <30 µm eine gesteigerte OXPHOS nach Oxamat-Gabe (Abbildung 6.18. B).

Die zusammengefasste Auswertung der OC-Zellen ergibt in beiden Medien erwartungsgemäß eine signifikante Reduktion in der ECAR und ebenfalls eine signifikante Steigerung der OCR. Dabei gibt der Unterschied der Effekte zwischen den Medien, der ebenfalls signifikant ist, an, dass die Änderungen im KHB mit Glukose jeweils stärker sind, als im *low-buffered* DMEM (Abbildung 6.18. C und D). Erneut wurde auch der Effekt von Oxamat auf Ebene der Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA untersucht. Hierbei zeichnet sich wieder ein sehr heterogenes Bild: Während einige Zellen schon ab geringen Oxamat Konzentrationen in der Verdopplungszeit deutlich eingeschränkt sind (OC_92, OC_108, OC_119, OC_128), sind die OC_38 Zellen der proliferativen Manipulation erst in sehr hohen Konzentrationen zugänglich (Tabelle 6.2.).

Tabelle 6.2. Proliferationsinhibitorische Auswirkung von Oxamatgabe auf OC-Zellen.

Im Vollmedium werden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM und 50 mM) Oxamat behandelt und deren Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert. In einem geeigneten Zeitraum wird die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt und diese relativ zur Verdopplungszeit der Kontrollzellen dargestellt. Ein Anstieg der Verdopplungszeit um den Faktor 1,2 (=20 %) wurde als Effekt betrachtet und deshalb farbig gekennzeichnet. Dabei stellen hellorange markierte Felder nur eine kurzfristige Wachstumsverzögerung dar, während dunkelorange markierte Felder eine dauerhafte Proliferationsinhibition über mindestens 4 Tage aufweisen. Ist ein Feld mit einem „-“ gekennzeichnet, so war die Verdopplungszeit dieser Zellen unter dieser Konzentration negativ.

	OC_38	OC_91 <30 µm	OC_91 >30 µm	OC_92	OC_108	OC_119	OC_122	OC_128
5 mM Oxamat	0,66	0,98	0,91	1,05	11,08	1,19	0,87	1,02
10 mM Oxamat	0,86	1,18	1,00	1,37	-	-	0,81	1,70
20 mM Oxamat	0,83	5,00	1,96	-	-	-	1,25	-
30 mM Oxamat	0,63	-	-	-	-	-	3,41	-
50 mM Oxamat	1,67	-	-	-	-	-	-	-

Wie in den vorangegangenen Experimenten wurden auch hier etablierte Zelllinien für die gleichen Untersuchungen herangezogen, um ein geeignetes Modellsystem für Experimente, die viele Zellen benötigen, zu finden. Hier fand die Messung der metabolischen Parameter OCR und ECAR im reinen KHB, in KHB mit Glukose und in *low-buffered* DMEM statt (Abbildung 6.19.). Durch Oxamat-Injektion ist die ECAR im KHB mit Glukose und im *low-buffered* DMEM in allen Zelllinien gesenkt. Die Effekte von Oxamat in KHB ohne Zusätze sollten nur zur Kontrolle

überprüft werden. Eine Veränderung der ECAR wurde nicht erwartet, da für die Laktatbildung Glukose notwendig ist. Dennoch konnte im reinen KHB in SKOV-3 und HeLa Zellen eine Reduktion der ECAR festgestellt werden.

Durch die Inhibition der LDH ist es einigen Zellen möglich, die Glukose, die nun nicht mehr zu Laktat verstoffwechselt werden kann, der ATP Bildung über OXPHOS zuzuführen. Diese Gegenregulation findet bei IGROV-1, HEY und A549 statt. Die Glukoseverwertung mittels OXPHOS findet aber, außer bei den IGROV-1, nur im KHB mit Glukose statt. Vermutlich werden unter *low-buffered* DMEM dann andere Stoffwechselwege vermehrt genutzt, um der verminderten ATP-Generierung nach Inhibition der Laktatproduktion entgegenzuwirken.

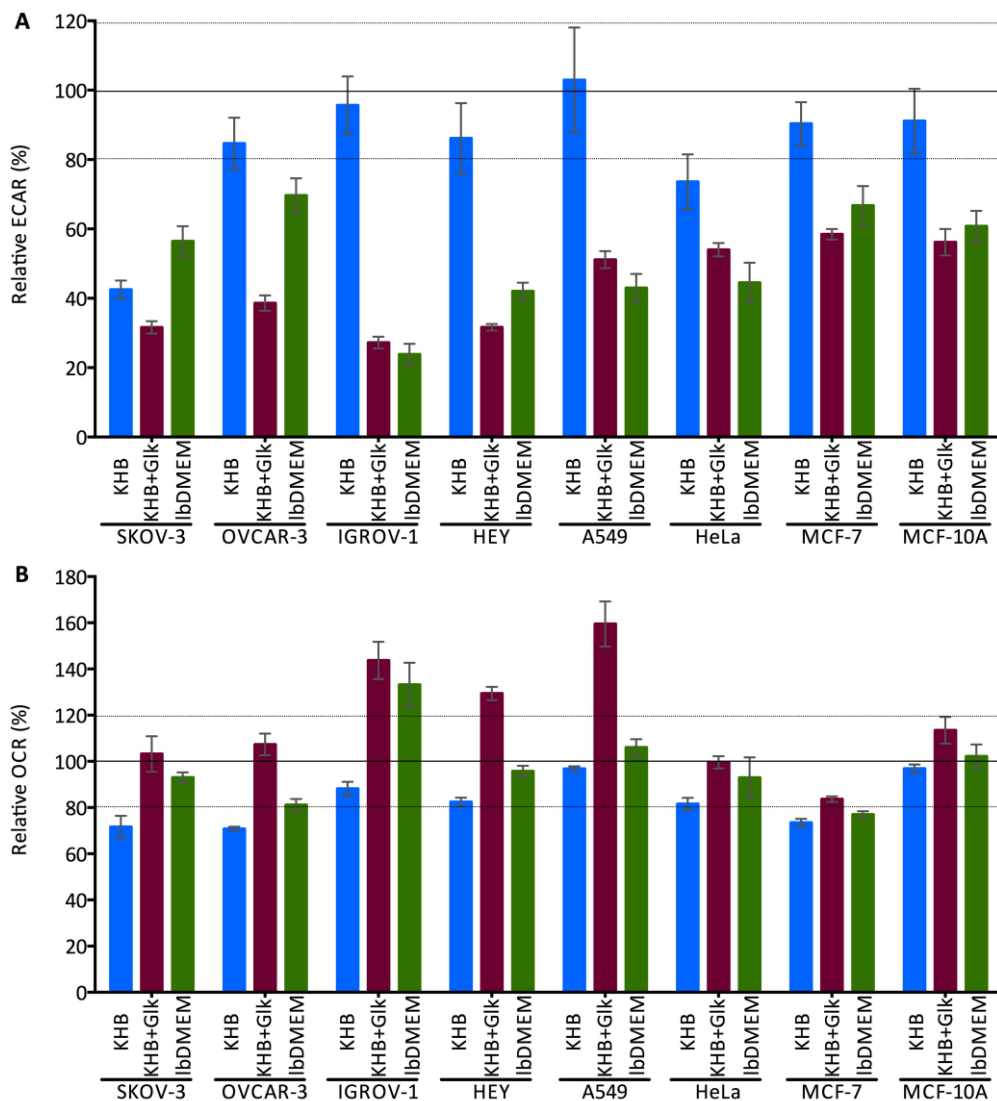


Abbildung 6.19. Metabolische Auswirkung von Oxamat-Gabe auf etablierte Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A.

In KHB ohne Zusätze, KHB mit 25 mM Glukose oder in *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin und 25 mM Glukose werden 50 mM Oxamat injiziert und die metabolische Auswirkung auf ECAR (**A**) und OCR (**B**) 36 min nach Injektion mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Die Änderungen werden relativ zu den basalen Werten vor Injektion von Oxamat berechnet. Ein Effekt wird als biologisch relevant angesehen, wenn eine Änderung um mindestens 20 % stattfindet. Aus diesem Grund sind diese Grenzwerte mit einer dünnen Linie gekennzeichnet.

Die Beobachtung der ECAR-Abnahme unter Mangelbedingungen (KHB) in SKOV-3 und HeLa wirft die Frage auf, welche Substrate in diesem Fall zur ECAR-Produktion genutzt werden können. Mit KHB werden keine exogenen Substrate hinzugefügt, sodass eine Nutzung endogener Substrate wahrscheinlich ist. Glykogen stellt beim Menschen die Hauptspeicherform von Kohlenhydraten dar und kann schnell zu Glukose abgebaut werden. Obwohl Glykogen hauptsächlich in der Leber und im Muskel vorkommt, verdichten sich in den letzten Jahren die Hinweise darauf, dass auch in Tumorzellen der Glykogenmetabolismus eine große Rolle spielt (Zois *et al.* 2014).

Deshalb sollte die endogene Glykogenmenge mit Hilfe des „Glykogen-Assay-Kits II“ (vgl. 5.2.3.6.) colorimetrisch bestimmt werden (Abbildung 6.20.). Nach der Bestimmung der Glykogenwerte der unterschiedlichen Zelllinien zeigt sich tatsächlich die größte Menge an Glykogen bei den SKOV-3 Zellen, welche auch den stärksten Oxamat-Effekt auf die ECAR im KHB aufweisen. Auch in HeLa Zellen, welche ebenfalls eine ECAR-Reduktion im KHB zeigen, ist endogenes Glykogen nachweisbar. Die übrigen Zellen weisen ebenfalls Glykogenspeicher auf, auf die aber scheinbar nicht zur Laktatproduktion unter Hungerbedingungen zurückgegriffen wird (Abbildung 6.19. A).

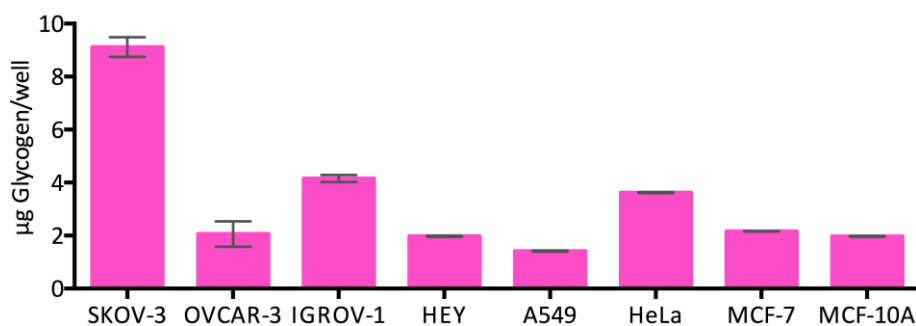


Abbildung 6.20. Colorimetrische Bestimmung der Glykogenmenge in etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A.

Für die Messung wurden gleiche Gesamtproteinmengen von jeder Zelllinie eingesetzt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten und die Glykogenmenge mit Hilfe des Glykogen-Assay-Kits II (Abcam, Cambridge) anhand eines Farbumschlags bei einer Absorption von 450 nm gemessen.

Nachdem in allen Zellen eine Inhibition der Laktatproduktion durch Oxamat nachgewiesen werden konnte, sollte nun überprüft werden, inwiefern durch die Blockade dieses für Tumorzellen wichtigen Stoffwechselweges die Proliferation dieser Zellen beeinflusst werden kann.

Dazu wurden die Zellen im Vollmedium ausgesät, mit unterschiedlichen Konzentrationen Oxamat behandelt und die Verdopplungszeit der Zellen unter der Behandlung mit Hilfe des xCELLigence RTCA bestimmt (Tabelle 6.3).

Bei 10 mM Oxamat zeigt keine der getesteten Zelllinien eine signifikante Proliferationsinhibition. Bei 40 mM Oxamat zeigt sich nur bei den Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3, OVCAR-3, IGROV-1 und HEY eine signifikante bis extrem signifikante Proliferationsinhibition im untersuchten Zeitraum, die Zellen A549, HeLa, MCF-7 und MCF-10A sind auch bei 40 mM Oxamat in der Verdopplungszeit nicht beeinflusst.

Tabelle 6.3. Proliferationsinhibitorische Auswirkung von Oxamatgabe auf etablierte Tumorzelllinien und die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A

Im Vollmedium werden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 mM und 40 mM) Oxamat behandelt und deren Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert. In einem geeigneten Zeitraum wird die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt und diese relativ zur Verdopplungszeit der Kontrollzellen dargestellt. Ein Anstieg der Verdopplungszeit um einen Faktor 1,2 (=20 %) wurde als Effekt betrachtet und deshalb farbig gekennzeichnet. Dunkelorange markierte Felder weisen eine dauerhafte Proliferationsinhibition über mindestens 4 Tage auf.

	SKOV-3	OVCAR-3	IGROV-1	HEY	A549	HeLa	MCF-7	MCF-10A
10mM Oxamate	1,04	0,99	1,15	0,92	0,99	0,86	0,91	0,99
40mM Oxamate	2,26	1,55	1,65	2,27	0,89	1,16	1,09	0,94

Die Oxamat-Effekte für die untersuchten Zelllinien sind sehr unterschiedlich. Durch die Tendenz der Gegenregulation der blockierten Laktatbildung in eine gesteigerte OXPHOS würden in diesem Fall IGROV-1 Zellen als Modellsystem für die OC-Zellen dienen. Bezüglich der Proliferation ist die Modellfindung deutlich schwieriger, da der proliferationsinhibitorische Effekt innerhalb der OC-Zellen sehr heterogen war.

6.2.3.3 Hemmung des mitochondrialen Fettsäuretransports mittels Etomoxir und dessen Einfluss auf Metabolismus und Proliferation

In einigen Experimenten (Daten nicht gezeigt) wurde beobachtet, dass Zellen, die sich im Mangelmedium ohne Zusätze befinden, sowohl eine relativ hohe basale als auch eine ATP-gekoppelte Respiration aufweisen. Da hierbei keine externe Zugabe von Substrat vorhanden ist, scheinen die Zellen auf weitere endogene Substrate zurückzugreifen. Eine weitere beliebte Speicherform in Zellen sind *Lipid-Droplets*, deren enthaltene Fettsäuren dann über β -Oxidation der ATP-Generierung zugeführt werden. In den letzten Jahren konnten in immer mehr Tumorzellen *Lipid-Droplets* nachgewiesen werden (Bozza & Viola 2010). Aus diesem Grund sollte die Inhibition der β -Oxidation über die Blockade des Carnitin-Shuttles mittels Etomoxir und deren Auswirkung auf Metabolismus und Proliferation der Zellen überprüft werden (Abbildung 6.21.).

Die Messung des Etomoxir Effekts findet im KHB ohne Zusätze statt, um sicherzustellen, dass die Zellen auf die Nutzung endogener Substrate angewiesen sind und um dadurch die β -Oxidation zu steigern.

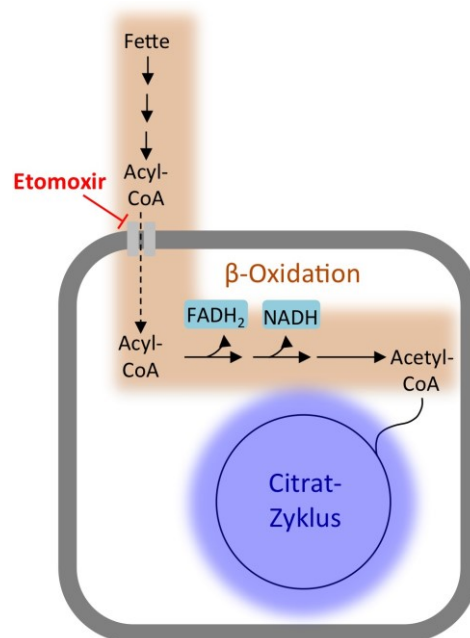


Abbildung 6.21. Übersichtsabbildung über die Wirkung von Etomoxir.

Etomoxir ist ein irreversibler Inhibitor der Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1). Die CPT1 befindet sich an der Außenseite der Mitochondrienmembran und ist dort für die Bildung von Acyl-Carnitinen verantwortlich, indem sie den Transfer der Acyl-Gruppe von Coenzym A auf Carnitin katalysiert. Dieser Schritt ist notwendig, um Fettsäuren vom Cytosol in die Mitochondrien zu transportieren. Demnach führt Etomoxir durch die Blockade des Fettsäure-Transports indirekt zur Inhibition der β -Oxidation.

Bei der Untersuchung der Etomoxir-Wirkung auf die OCR mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers auf die patientenabgeleiteten Tumorzellen zeigt sich nur in den Zellen OC_38, OC_108 und OC_122 durch Etomoxir-Gabe eine Reduktion der OCR, die stärker als 20 % ist (Abbildung 6.22. A). Betrachtet man diese Gruppe aber als biologische Replikate, zeigt sich dass diese Abnahme dennoch signifikant ist (Abbildung 6.22. B). Dies deutet darauf hin, dass in diesen Zellen durch die β -Oxidation endogener Fettreserven unter Sauerstoffverbrauch Energie gewonnen wird. Aus diesem Grund sollte auch hier die Auswirkung der Blockade der β -Oxidation auf Ebene der Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA untersucht werden. Bei einer Konzentration von 40 μ M Etomoxir zeigt sich aber in den mit Etomoxir behandelten Zellen keine Reduktion der Verdopplungszeit im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 6.22. C). Dies kann dem Einsatz von unterschiedlichen Medien geschuldet sein. Die Messung der OCR unter Etomoxir findet im KHB statt, damit für die Atmung keine exogenen Substrate zur Verfügung stehen. Da die Zellen aber über einen längeren Zeitraum im reinen KHB nicht überleben würden, findet die Proliferationsmessung im Vollmedium statt.

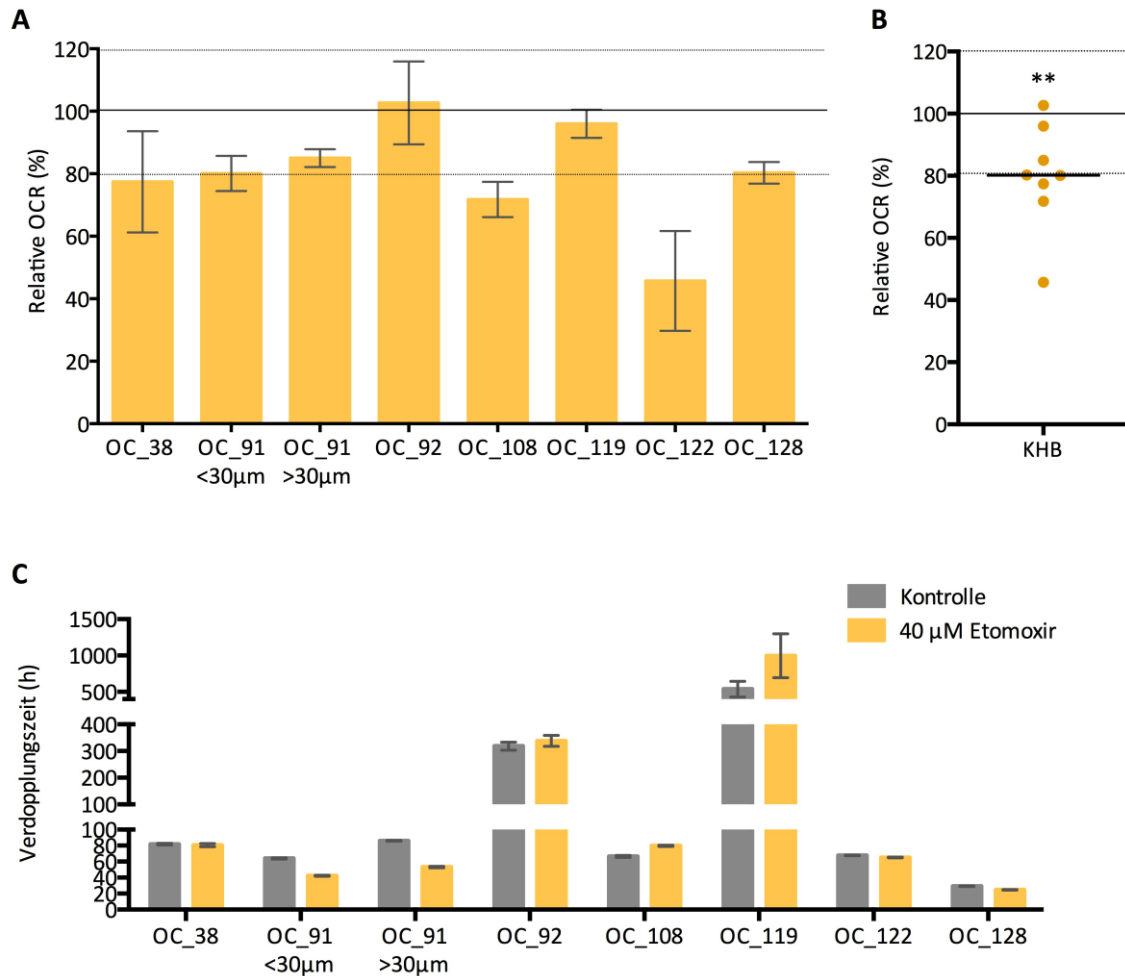


Abbildung 6.22. Metabolische und proliferationsinhibitorische Auswirkung von Etomoxirgabe auf OC-Zellen.

A) In KHB werden 40 µM Etomoxir injiziert und die metabolische Auswirkung auf die OCR 36 min nach Injektion mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Die Änderungen werden relativ zu den basalen Werten vor Injektion von Etomoxir berechnet. Ein Effekt wird als biologisch relevant angesehen, wenn eine Änderung um mindestens 20 % stattfindet. Aus diesem Grund sind diese Grenzwerte mit einer dünnen Linie gekennzeichnet. **B)** Die unterschiedlichen OC-Zellen werden als biologische Replikate zusammengefasst und die OCR unter Berechnung der Signifikanz der Effekte dargestellt (t-Test). Horizontale Striche geben den Median der Replikate an. **C)** Im Vollmedium werden die Zellen mit 40 µM Etomoxir behandelt und deren Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert. In einem geeigneten Zeitraum wird die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt und diese im Vergleich zu den Kontrollzellen dargestellt.

Unter den Zelllinien zeigen alle (außer IGROV-1) eine starke Abhängigkeit von der β -Oxidation, da durch 40 µM Etomoxir der vorhandene Rest-Sauerstoffverbrauch im KHB auf 75-35 % gesenkt wird (Abbildung 6.23. A). Durch eine höhere Konzentration von Etomoxir kann die OCR sogar noch weiter reduziert werden. Von der Darstellung dieser Daten wurde aber aufgrund möglicher *off-target* Effekte ab einer Konzentration über 40 µM abgesehen (Daten nicht gezeigt).

Obwohl auch im Vollmedium nach Gabe von Etomoxir ein deutlicher Effekt auf den Metabolismus festgestellt werden kann (Daten nicht gezeigt) ist kein langfristiger Effekt auf die Proliferation der Zellen zu erkennen (Abbildung 6.23. B).

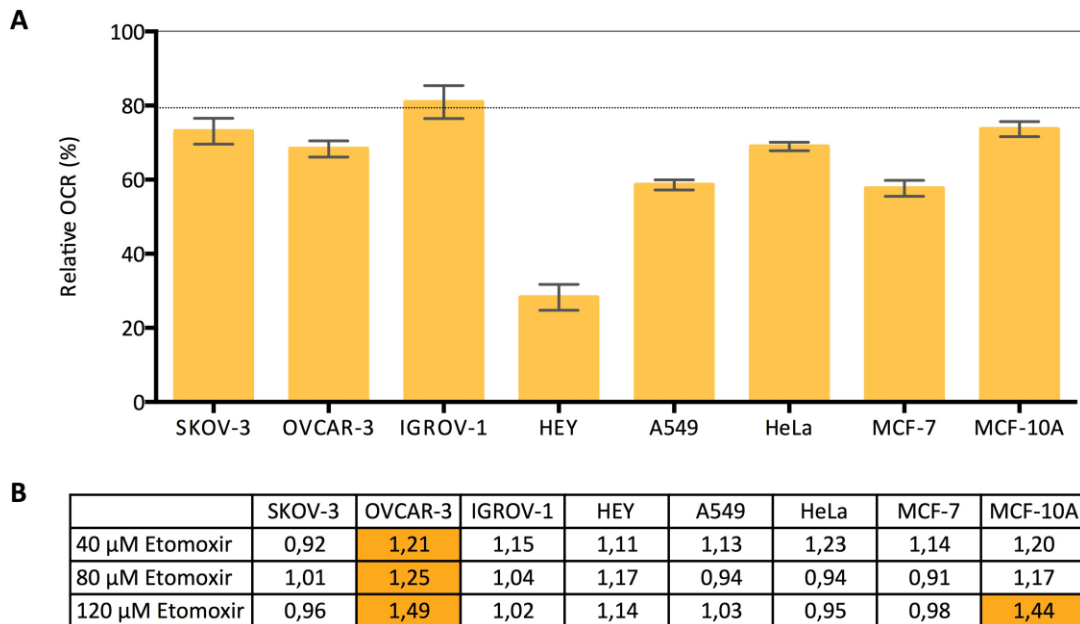


Abbildung 6.23. Metabolische und proliferationsinhibitorische Auswirkung von Etomoxirgabe auf etablierte Tumorzelllinien und die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A.

A) In KHB werden 40 μ M Etomoxir injiziert und die metabolische Auswirkung auf die OCR 36 min nach Injektion mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Die Änderungen werden relativ zu den basalen Werten vor Injektion von Etomoxir berechnet. Ein Effekt wird als biologisch relevant angesehen, wenn eine Änderung um mindestens 20 % stattfindet. Aus diesem Grund sind diese Grenzwerte mit einer dünnen Linie gekennzeichnet. **B)** Im Vollmedium werden die Zellen mit 40 μ M Etomoxir behandelt und deren Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert. In einem geeigneten Zeitraum wird die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt und diese relativ zur Verdopplungszeit der Kontrollzellen dargestellt. Ein Anstieg der Verdopplungszeit um den Faktor 1,2 (=20 %) wurde als Effekt betrachtet und deshalb farbig gekennzeichnet. Dabei stellen hellorange markierte Felder nur eine kurzfristige Wachstumsverzögerung dar.

Die Injektion von Etomoxir führt also, die OC-Zellen als Einheit betrachtet, zur signifikanten Verminderung der Atmung. Dies trifft mit Ausnahme der IGROV-1 Zellen auch auf die etablierten Zelllinien zu. Die Inhibition der Proliferation durch 40 μ M Etomoxir war in keiner der OC-Zellen möglich und auch für die etablierten Zelllinien zeigt sich diesbezüglich, abgesehen von OVCAR-3 Zellen, die zumindest eine kurzzeitige Proliferationsinhibition aufweisen, kein Effekt.

6.2.3.4 Hemmung der Fettsäure-Synthese durch Inhibition der ACLY mit Hilfe von SB204990 und dessen Einfluss Metabolismus und Proliferation

Wie bereits einleitend beschrieben, ist bekannt, dass Tumorzellen sowohl von Fettauf- als auch Fettabbau abhängig sind. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Etomoxir, welches den Fettabbau inhibiert, in den meisten Tumorzellen einen starken Einfluss auf die OCR hat, wurde nun der Einfluss der Inhibition des Fettaufbaus untersucht werden. Dazu wird SB204990 als Inhibitor der ACLY (ATP-Citrat-Lyase) eingesetzt (Abbildung 6.24.). Durch den Einsatz dieses Inhibitors konnten schon große Erfolge in der Inhibition von Proliferation und Überleben von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* erzielt werden (Hatzivassiliou et al., 2005). Neben der Bedeutung der ACLY für die *de novo* Lipidsynthese spielt sie auch eine Rolle im Citrat-Malat-Shuttle. Dieser bietet eine der Möglichkeiten, NADH, welches in der Glykolyse anfällt, in die Mitochondrien zu transportieren (vgl. 4.4.5.). Aufgrund dieser beiden Funktionen sollte die Bedeutung der ACLY näher betrachtet werden. Zu diesem Zweck wurden metabolische und proliferationsinhibitorische Auswirkungen von SB204990 untersucht und überprüft, ob die bereits erzielten Erfolge auch auf Ovarialkarzinome übertragbar sind.

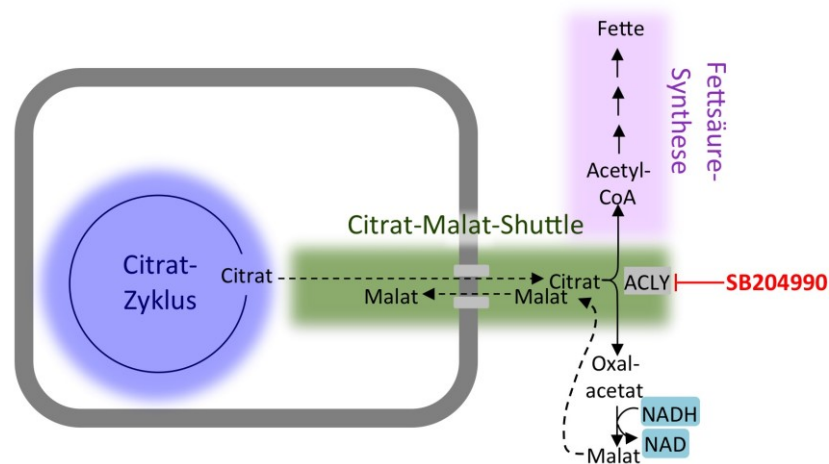


Abbildung 6.24. Übersichtsabbildung über die Wirkung von SB204990.

SB204990 ist ein Inhibitor der ATP-Citrat-Lyase und verhindert somit die Spaltung von Citrat zu Oxalacetat und Acetyl-CoA.

Für die Untersuchung der metabolischen Auswirkung des Inhibitors wurden zunächst die Basalwerte von OCR und ECAR im *low-buffered* DMEM mit Glutamin und Glukose mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers bestimmt und die Änderungen 36 min nach Injektion des Inhibitors relativ zu den Ausgangswerten berechnet. Dabei zeigt sich keine signifikante Änderung in OCR und ECAR für die patientenabgeleiteten Tumorzellen (Abbildung 6.25.).

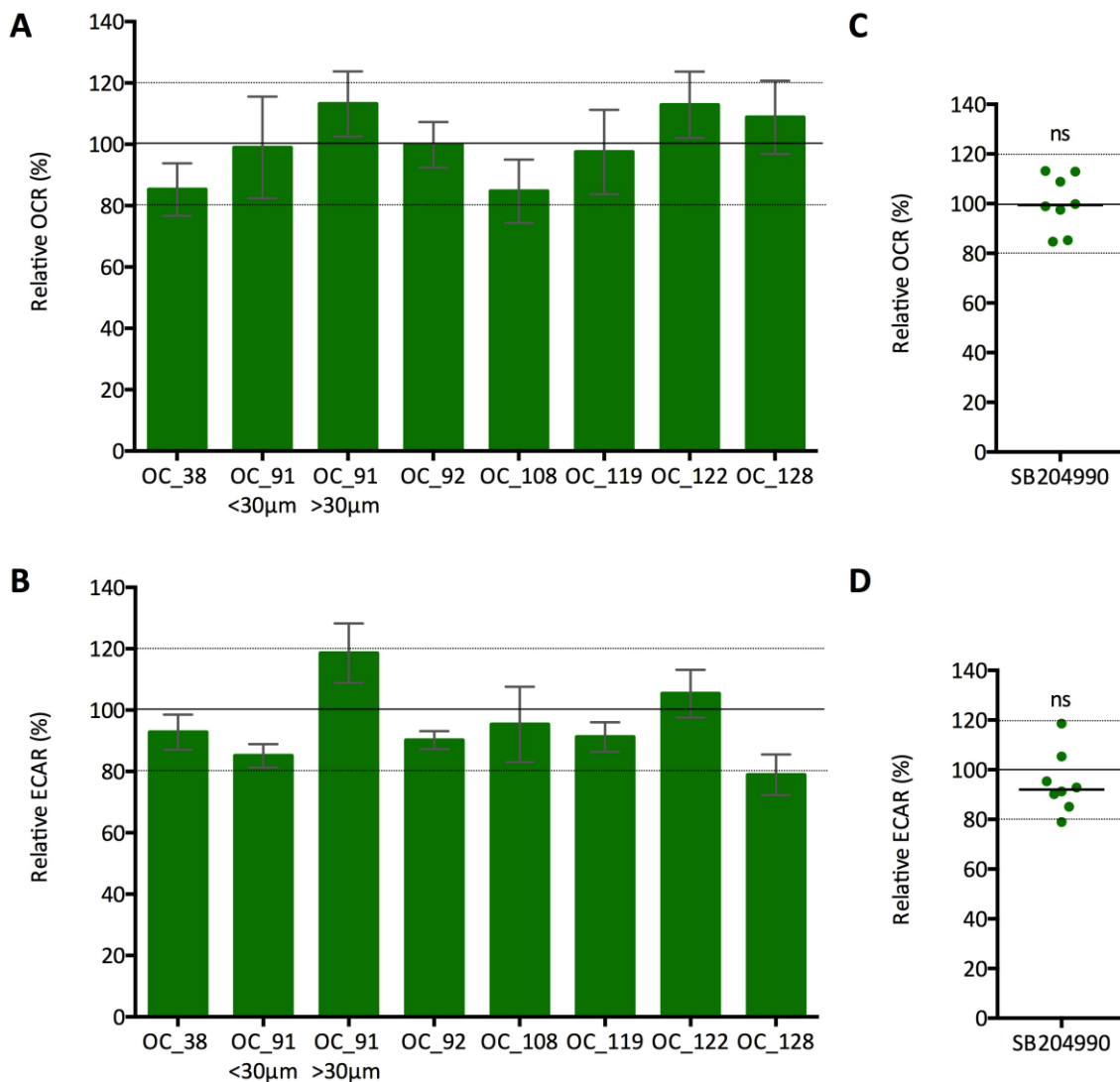


Abbildung 6.25. Metabolische Auswirkung von SB204990-Gabe auf OC-Zellen.

In *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin und 25 mM Glukose werden 25 µM SB204990 injiziert und die metabolische Auswirkung auf OCR (**A**) und ECAR (**B**) 36 min nach Injektion mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Die Änderungen werden relativ zu den basalen Werten vor Injektion von SB204990 berechnet. Ein Effekt wird als biologisch relevant angesehen, wenn eine Änderung um mindestens 20 % stattfindet. Aus diesem Grund sind diese Grenzwerte mit einer dünnen Linie gekennzeichnet. **C**) und **D**) Die unterschiedlichen OC-Zellen werden als biologische Replikate zusammengefasst und die OCR (**C**) und ECAR (**D**) unter Berechnung der Signifikanz der Effekte dargestellt (t-Test). Horizontale Striche geben den Median der Replikate an. ns=nicht signifikant

Weiterhin wurde auch die Auswirkung der ACLY-Inhibition auf die Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert (Tabelle 6.4.). Einhergehend mit den Daten der metabolischen Auswirkung zeigt sich auch bezüglich der Proliferation nur eine schwache Reaktion durch die Blockade des Citrat-Malat-Shuttles bzw. der Lipidsynthese. Unter den patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen erweisen sich die OC_38 als die am sensitivsten Zellen und zeigen eine proliferationsinhibitorische Reaktion ab einer Konzentration von 30 µM. Außerdem weisen die Zellen OC_108 und OC_119 ab 50 µM eine Wachstumsinhibition auf. Auch OC_91 >30 µM

zeigen ab 50 μM SB204990 eine proliferationsinhibitorische Wirkung, die aber nur von kurzer Dauer ist. Alle anderen Zelllinien sind bezüglich der Proliferation selbst bei einer Konzentration von 50 μM resistent gegenüber der Blockade der ACLY.

Tabelle 6.4. Proliferationsinhibitorische Auswirkung durch SB204990-Gabe auf OC-Zellen.

Im Vollmedium werden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (5 μM , 10 μM , 15 μM , 30 μM und 50 μM) SB204990 behandelt und deren Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert. In einem geeigneten Zeitraum wird die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt und diese relativ zur Verdopplungszeit der Kontrollzellen dargestellt. Ein Anstieg der Verdopplungszeit um den Faktor 1,2 (=20 %) wurde als Effekt betrachtet und deshalb farbig gekennzeichnet. Dabei stellen hellorange markierte Felder nur eine kurzfristige Wachstumsverzögerung dar, während dunkelorange markierte Felder eine dauerhafte Proliferationsinhibition über mindestens 4 Tage aufweisen.

	OC_38	OC_91 <30 μM	OC_91 >30 μM	OC_92	OC_108	OC_119	OC_122	OC_128
5 μM SB204990	1,10	0,95	1,04	0,99	1,11	0,92	0,95	1,00
10 μM SB204990	1,13	0,91	0,91	0,79	0,86	0,93	1,07	0,94
15 μM SB204990	1,16	0,96	0,84	0,90	0,77	0,74	1,13	0,99
30 μM SB204990	1,21	1,10	0,85	0,81	0,88	0,86	0,98	0,99
50 μM SB204990	1,76	1,20	1,25	0,82	1,39	3,77	0,70	1,14

Ebenso wurde die Wirkung des ACLY-Inhibitors auf die etablierten Zelllinien getestet. Anders als die OC-Zellen weisen die etablierten Zelllinien starke metabolische Reaktionen auf die Injektion von SB204990 im Seahorse XFe Analyzer auf.

Die Inhibition der ACLY hat im *low-buffered* DMEM mit Glutamin und Glukose in allen Zelllinien außer A549 und MCF-10A ein Absenken der OCR zur Folge. Außerdem steigt die ECAR nach Inhibition der ATP-Citrat-Lyase in SKOV-3, OVCAR-3, A549, MCF-7 und MCF-10A an (Abbildung 6.26.).

Zusätzlich sollte auch für die etablierten Zelllinien die proliferationsinhibitorische Wirkung des Inhibitors mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert werden. Dabei zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Verdopplungszeit bei SKOV-3, OVCAR-3, IGROV-1 und A549, die jedoch nicht von langfristiger Dauer ist (Abbildung 6.26. C).

Außerdem ist zu beobachten, dass die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A der Manipulation durch SB204990 weder auf metabolischer noch auf proliferativer Ebene gut zugänglich ist. Dies stellt die Hauptvoraussetzung bei der Entwicklung therapeutischer Ansätze dar. Hierbei sollen Krebszellen beeinflussbar sein, während die nicht-Tumorzellen keinerlei Beeinträchtigung aufweisen. Um sicher zu gehen, dass dies auch noch unter metabolischen Stressbedingungen der Fall ist, wurde versucht, die Zellen metabolisch in die Enge zu treiben und die Untersuchungen des Metabolismus und der Proliferationsinhibition im KHB mit Glukose wiederholt.

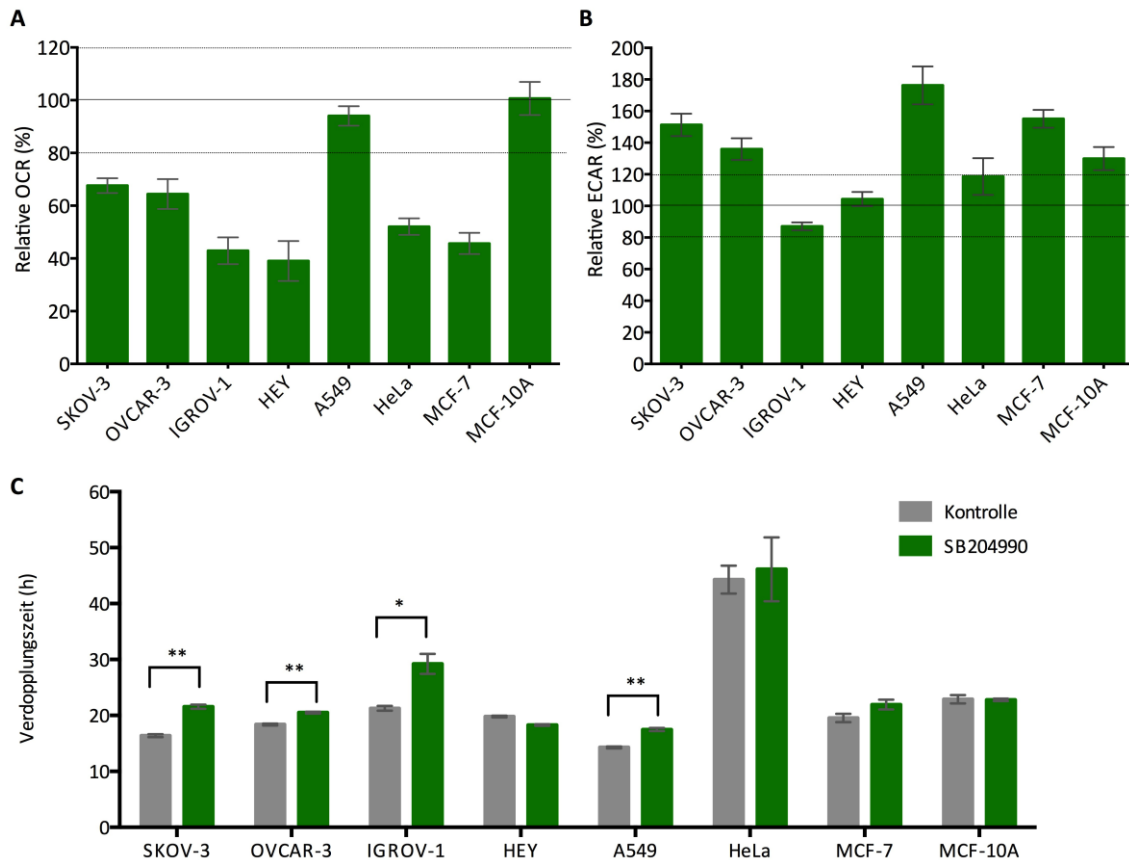


Abbildung 6.26. Metabolische und proliferationsinhibitorische Auswirkung von SB204990-Gabe auf etablierte Tumorzelllinien und die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A.

In *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin und 25 mM Glukose werden 25 μ M SB204990 injiziert und die metabolische Auswirkung auf OCR (**A**) und ECAR (**B**) 36 min nach Injektion mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Die Änderungen werden relativ zu den basalen Werten vor Injektion von SB204990 berechnet. Ein Effekt wird als biologisch relevant angesehen, wenn eine Änderung um mindestens 20 % stattfindet. Aus diesem Grund sind diese Grenzwerte mit einer dünnen Linie gekennzeichnet. **C**) Im Vollmedium werden die Zellen mit 10 μ M SB204990 behandelt und deren Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert. In einem geeigneten Zeitraum wird die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt und diese im Vergleich zur Verdopplungszeit der Kontrollzellen, welche mit dem Lösungsmittel behandelt wurden, dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede der Triplikate wurde mittels t-Test bestimmt. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Schränkt man die metabolische Flexibilität der MCF-10A Zellen ein, indem man ihnen nur Glukose als exogenes Substrat zur Verfügung stellt (KHB+Glukose), sieht man, dass unter diesen Mangelbedingungen ein Effekt auf die OCR sowohl für MCF-10A als auch SKOV-3 Zellen auftritt, der in SKOV-3 Zellen bereits im *low-buffered* DMEM zu verzeichnen war. Der Anstieg der ECAR im KHB mit Glukose fällt für die SKOV-3 Zellen wesentlich schwächer aus, während für die MCF-10A keine Änderung vorliegt (Abbildung 6.27. A und B).

Der Vergleich der Proliferationsinhibition im Vollmedium und KHB+Glk zeigt eine signifikant minimierte Proliferation bei den SKOV-3 Zellen im Vollmedium durch 10 μ M SB204990. Diese ist noch wesentlich deutlicher im KHB+Glk. Bei den MCF-10A Zellen hingegen ist in keinem der beiden Medien eine Proliferationsinhibition zu beobachten, obwohl gezeigt wurde, dass im KHB+Glukose eine Absenkung der OCR zu verzeichnen ist (Abbildung 6.27. C).

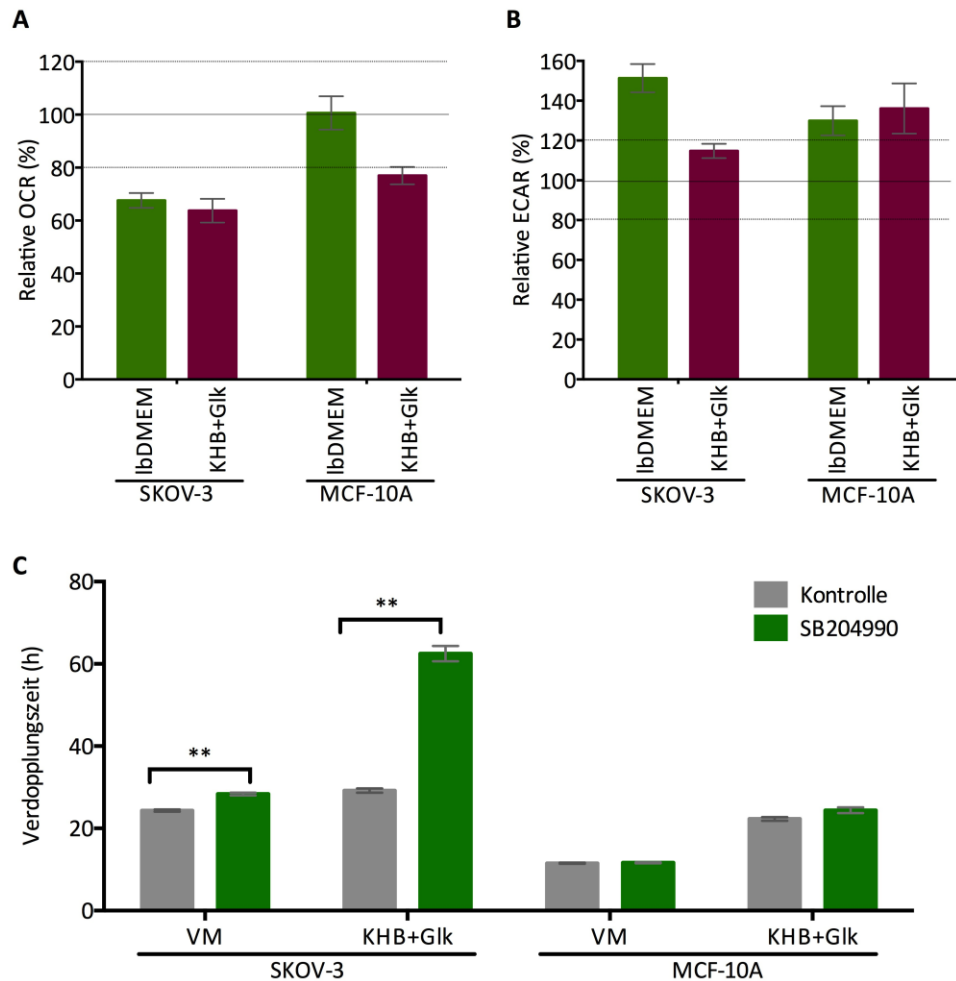


Abbildung 6.27. Metabolische und proliferationsinhibitorische Auswirkung von SB204990-Gabe auf die etablierte Tumorzelllinie SKOV-3 und die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A in unterschiedlichen Medien.

In KHB mit 25 mM Glukose oder *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin und 25 mM Glukose werden 25 μ M SB204990 injiziert und die metabolische Auswirkung auf OCR (A) und ECAR (B) 36 min nach Injektion mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers in den Zelllinien SKOV-3 und MCF-10A untersucht. Die Änderungen werden relativ zu den basalen Werten vor Injektion von SB204990 berechnet. Ein Effekt wird als biologisch relevant angesehen, wenn eine Änderung um mindestens 20 % stattfindet. Aus diesem Grund sind diese Grenzwerte mit einer dünnen Linie gekennzeichnet. C) Im Vollmedium (VM) oder KHB mit 25 mM Glukose (KHB+Glk) werden die Zellen mit 10 μ M SB204990 behandelt und deren Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert. In einem geeigneten Zeitraum wird die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt und diese im Vergleich zur Verdopplungszeit der Kontrollzellen, welche mit dem Lösungsmittel behandelt wurden, dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede der Triplikate wurde mittels t-Test bestimmt. **p<0,01

Zum Zwecke der Etablierung von Modellsystemen für die OC-Zellen wurden diese mit bereits etablierten Zelllinien verglichen. Obwohl MCF-10A Zellen hier nur repräsentativ für nicht-Tumorzellen mitgeführt wurden, wäre diese im Falle der Untersuchung des SB204990-Effektes die einzig mögliche Modellzelllinie. Genau wie die OC-Zellen zeigen MCF-10A Zellen keinerlei Effekte auf die OCR und sind auch nicht in ihrer Proliferation zu beeinflussen. Lediglich ein kleiner ECAR-Anstieg ist durch die SB204990-Injektion in MCF-10A Zellen zu verzeichnen, der nicht mit den ECAR-Effekten der OC-Zellen übereinstimmt. Möglicherweise sollten hier weitere Zelllinien getestet werden, um ein besser geeignetes Modellsystem zu finden.

6.2.3.5 Einfluss der Malat-Aspartat-Shuttle Blockade durch Inhibition der AST mit Hilfe von AOA auf Metabolismus und Proliferation

In dem meisten Tumorzelllinien konnten nach Inhibition des Citrat-Malat-Shuttles metabolische Effekte gezeigt werden. Sollten diese Effekte daraus resultieren, dass die Blockade der ACLY und damit des Citrat-Malat-Shuttles verhindert, dass NADH in die Mitochondrien gelangt, muss man in Betracht ziehen, dass für diesen Transport noch weitere Systeme zur Verfügung stehen.

Einer dieser weiteren Systeme ist der Malat-Aspartat-Shuttle (Abbildung 6.28.) (vgl. 4.4.5.).

Die Relevanz des Malat-Aspartat-Shuttles für die unterschiedlichen Zelltypen kann durch die Inhibition der Aspartat-Transaminase (AST) mit Hilfe von AOA untersucht werden (Abbildung 6.28.).

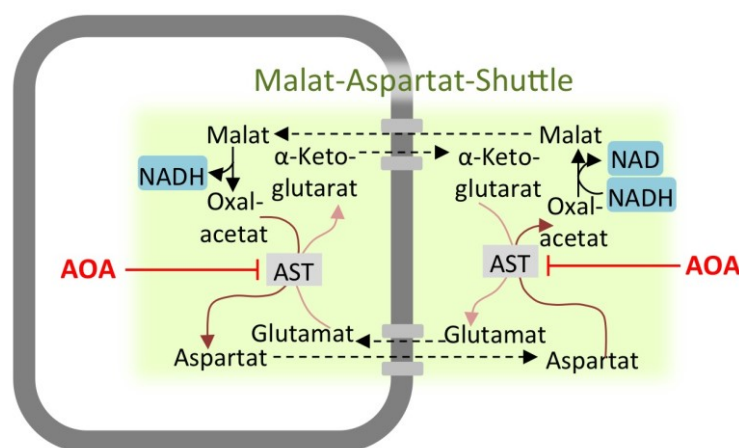


Abbildung 6.28. Übersichtsabbildung über die Funktion des Malat-Aspartat-Shuttles und die Wirkung von AOA

AOA (O-(Carboxymethyl)hydroxylamine hemihydrochloride) ist ein Inhibitor der Aspartat-Transaminase, welche ein essentieller Bestandteil des Malat-Aspartat-Shuttles ist. Die Inhibition des Malat-Aspartat-Shuttles verhindert die Reoxidation von cytosolischem NADH. Details sind im Text zu finden (vgl. 4.4.5.).

Die Untersuchung der metabolischen Bedeutung des Malat-Aspartat Shuttles wird im *low-buffered* DMEM mit Glutamin und Glukose durchgeführt, um sicherzugehen, dass nicht eine der beteiligten Komponenten im Mangel vorliegt. Nachdem die Messung der Basalwerte von OCR und ECAR mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers stattgefunden hat, erfolgt die Injektion des Inhibitors AOA. Die Änderungen in OCR und ECAR werden 36 min nach Injektion relativ zu den Ausgangswerten berechnet.

Die Inhibition der AST würde dazu führen, dass das in der Glykolyse anfallende NADH nicht mehr in die Mitochondrien gelangen kann. Demnach wäre eine Reduktion der OCR zu erwarten. Außerdem müsste das NADH, welches nun im Cytoplasma akkumuliert, auf anderem Wege recycelt werden, um ein Erliegen der Glykolyse zu verhindern. Dies könnte zum Beispiel durch eine gesteigerte Laktatproduktion bewerkstelligt werden. Deshalb wäre auch eine Steigerung der ECAR zu erwarten.

Genau wie für die Inhibition des Citrat-Malat-Shuttles zeigt sich für die Inhibition des Malat-Aspartat-Shuttles unter den OC-Zellen keine Signifikante Änderung in OCR und ECAR (Abbildung 6.29.). Betrachtet man die einzelnen Linien der patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen, ist die zu erwartende Reduktion der OCR nur in OC_38 und OC_122 zu verzeichnen. Die ECAR wird jedoch in diesen Zellen nicht gesteigert. Die erwartete Steigerung der Laktatproduktion ist nur in den OC_91 <30 µm zu verzeichnen, obwohl die OCR nicht abgesenkt wird. Bei den übrigen Zellen ist keine metabolische Reaktion zu beobachten.

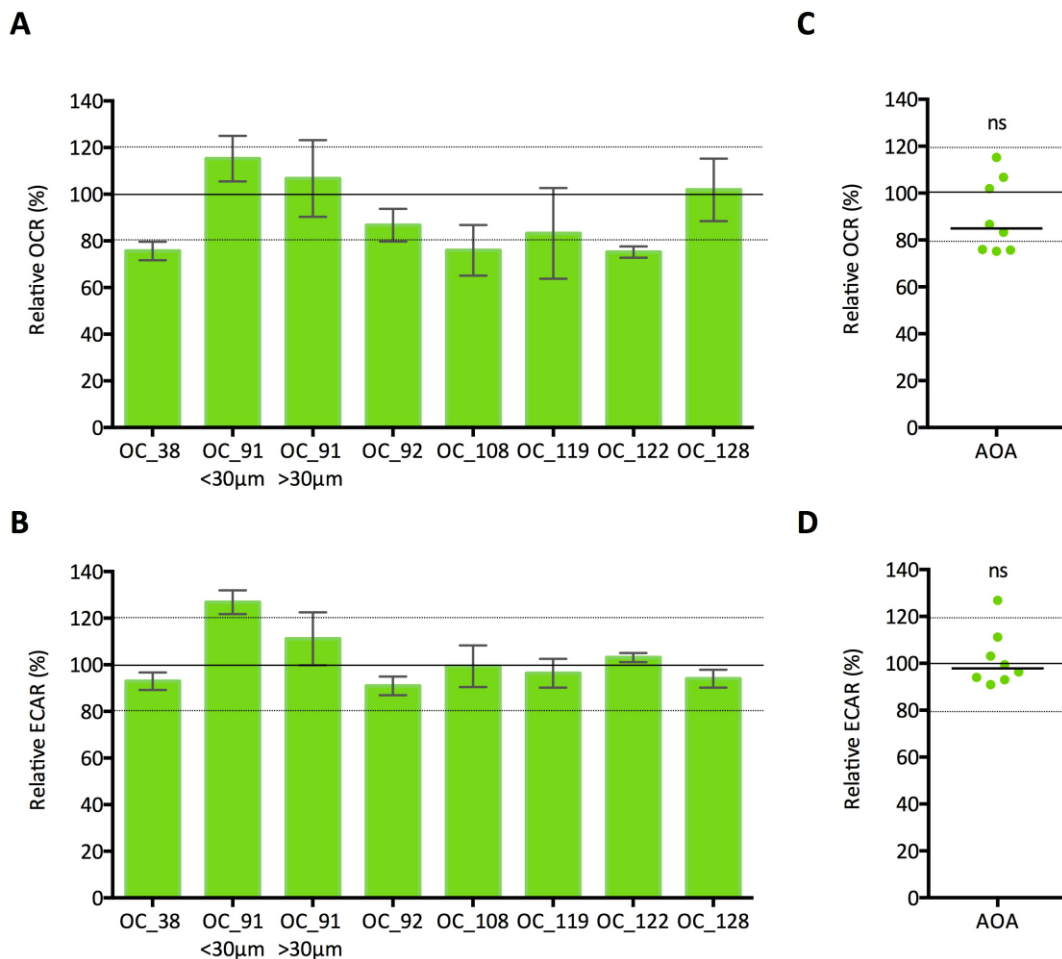


Abbildung 6.29. Metabolische Auswirkung von AOA-Gabe auf OC-Zellen.

In *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin und 25 mM Glukose werden 1 mM AOA injiziert und die metabolische Auswirkung auf OCR (**A**) und ECAR (**B**) 36 min nach Injektion mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Die Änderungen werden relativ zu den basalen Werten vor Injektion von AOA berechnet. Ein Effekt wird als biologisch relevant angesehen, wenn eine Änderung um mindestens 20 % stattfindet. Aus diesem Grund sind diese Grenzwerte mit einer dünnen Linie gekennzeichnet. **C**) und **D**) Die unterschiedlichen patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen werden als biologische Replikate zusammengefasst und die OCR (**C**) und ECAR (**D**) unter Berechnung der Signifikanz der Effekte dargestellt (t-Test). Horizontale Striche geben den Median der Replikate an. ns=nicht signifikant

Nach der Untersuchung der metabolischen Auswirkung der Blockade des Malat-Aspartat-Shuttles sollte auch die Wirkung von AOA auf die Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA untersucht werden. Dazu wurden die Zellen in ihrem jeweiligen Kulturmedium ausgesät und nach Sicherstellen des Wachstums mit unterschiedlichen Konzentrationen AOA behandelt.

Im Gegensatz zur metabolischen Wirkung von AOA ist die proliferationsinhibitorische Wirkung von AOA unerwartet stark. Abgesehen von OC_38, die im getesteten Bereich vollständig resistent in der Wirkung von AOA auf die Proliferation sind und OC_91 <30 µm, deren Proliferationsinhibition erst ab 800 µM beginnt, ist in allen anderen Zellen eine proliferationsinhibitorische Wirkung von AOA bereits in geringen Konzentrationen zu verzeichnen (Tabelle 6.5.).

Tabelle 6.5. Proliferationsinhibitorische Auswirkung von AOA-Gabe auf OC-Zellen.

Im Vollmedium werden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 mM, 0,3 mM, 0,6 mM, 0,8 mM und 1 mM) AOA behandelt und deren Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert. In einem geeigneten Zeitraum wird die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt und diese relativ zur Verdopplungszeit der Kontrollzellen dargestellt. Ein Anstieg der Verdopplungszeit um den Faktor 1,2 (=20 %) wurde als Effekt betrachtet und deshalb farbig gekennzeichnet. Dabei stellen hellorange markierte Felder nur eine kurzfristige Wachstumsverzögerung dar, während dunkelorange markierte Felder eine dauerhafte Proliferationsinhibition über mindestens 4 Tage aufweisen. Ist ein Feld mit einem „-“ gekennzeichnet, so war die Verdopplungszeit dieser Zellen unter dieser Konzentration negativ.

	OC_38	OC_91 <30µm	OC_91 >30µm	OC_92	OC_108	OC_119	OC_122	OC_128
100 µM AOA	1,14	1,13	1,07	0,97	0,94	1,04	0,93	1,17
300 µM AOA	0,79	1,13	1,28	1,79	1,14	1,32	1,43	1,30
600 µM AOA	0,60	1,08	1,70	1,71	-	1,32	1,79	1,69
800 µM AOA	0,67	1,34	1,53	3,49	3,35	1,57	1,88	1,31
1 mM AOA	0,62	1,62	1,79	-	-	1,65	1,78	1,83

Auch für die Untersuchung des Inhibitors AOA wurden etablierte Zelllinien mitgeführt, um ein Modellsystem zu finden und zu etablieren. Bei dieser Untersuchung zeigen SKOV-3 Zellen eine starke Reaktion auf die Injektion von AOA, sowohl was den Sauerstoffverbrauch als auch die Laktatproduktion angeht. Offenbar nimmt für diese Zellen die Funktion des Malat-Aspartat-Shuttles einen großen Stellenwert ein (Abbildung 6.30. A und B).

Auf der Ebene der Proliferation zeigt sich aber, dass diese Zellen erst ab einer Konzentration von 1 mM eine langanhaltende Proliferationsinhibition zeigen (Abbildung 6.30. C).

Im Gegensatz dazu zeigen OVCAR-3 und IGROV-1 keine Reaktion auf metabolischer Ebene auf die Injektion von AOA. Trotzdem zeigen sie bereits bei einer Konzentration von 600 µM eine langanhaltende Proliferationsinhibition (Abbildung 6.30.).

Es besteht aber auch im Falle von MCF-7 und MCF-10A die Möglichkeit, dass die Zellen weder bezüglich ihres Metabolismus noch in der Proliferation bei geringen Konzentrationen beeinflusst sind. HEY, HeLa und A549 zeigen nur eine Wirkung von AOA auf den Sauerstoffverbrauch, verhalten sich aber völlig unterschiedlich im Wachstum. Während HEY und HeLa bereits bei 800 µM eine langfristige Proliferationsinhibition aufweisen, zeigt sich dieses bei den A549 erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen von AOA.

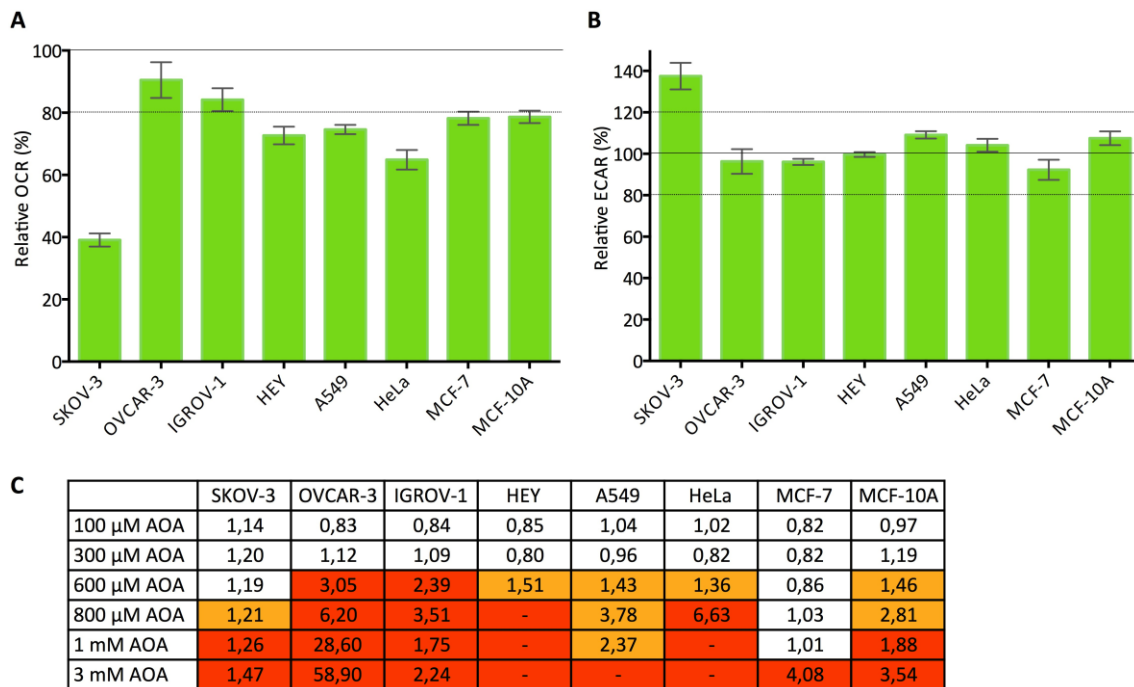


Abbildung 6.30. Metabolische und proliferationsinhibitorische Auswirkung von AOA-Gabe auf etablierte Tumorzelllinien und die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A.

In *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin und 25 mM Glukose werden 0,3 mM AOA injiziert und die metabolische Auswirkung auf OCR (**A**) und ECAR (**B**) 36 min nach Injektion mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Die Änderungen werden relativ zu den basalen Werten vor Injektion von AOA berechnet. Ein Effekt wird als biologisch relevant angesehen, wenn eine Änderung um mindestens 20 % stattfindet. Aus diesem Grund sind diese Grenzwerte mit einer dünnen Linie gekennzeichnet. **C**) Im Vollmedium werden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 mM, 0,3 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1 mM und 3 mM) AOA behandelt und deren Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert. In einem geeigneten Zeitraum wird die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt und diese relativ zur Verdopplungszeit der Kontrollzellen dargestellt. Ein Anstieg der Verdopplungszeit um 20 % wurde als Effekt betrachtet und deshalb farbig gekennzeichnet. Dabei stellen hellorange markierte Felder nur eine kurzfristige Wachstumsverzögerung dar, während dunkelorange markierte Felder eine dauerhafte Proliferationsinhibition über mindestens 4 Tage aufweisen. Ist ein Feld mit einem „-“ gekennzeichnet, so war die Verdopplungszeit dieser Zellen unter dieser Konzentration negativ.

Für die Untersuchung des AOA Effektes auf metabolischer Ebene könnten die Zelllinien OVCAR-3 und IGROV-1 herangezogen werden, da diese, wie auch die OC-Zellen, keine metabolische Regulation durch die Blockade der AST aufweisen. Auch auf proliferativer Ebene wäre ein Vergleich der beiden Zelllinien mit der Mehrheit der OC-Zellen möglich.

6.2.4 Synergistische Effekte der Kombination von metabolischen Inhibitoren auf Proliferation von OC-Zellen, etablierten Tumorzelllinien und der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A

Bisher wurden nur Einzelsubstanzen auf ihre proliferationsinhibitorische Wirkung untersucht. Da hierbei aber häufig hohe Konzentrationen eingesetzt werden mussten, um langfristige wachstumsinhibierende Effekte zu erreichen, wurde die Wirkung der Kombination der metabolischen Inhibitoren getestet. Dabei wurden Konzentrationen verwendet, die als Einzelsubstanz noch keinen Effekt bei der jeweiligen Zelllinie hervorrufen (Daten in Vorexperimenten generiert) (Abbildung 6.31. A). Durch eine geringere Konzentration der einzelnen Inhibitoren könnten *off-target* Effekte reduziert werden. Durch die Kombination unterschiedlicher Substanzen kann eine metabolische Zwangssituation für die Zellen erzeugt und deren metabolische Flexibilität eingeschränkt werden. Dazu wurden die Zellen im jeweiligen Kulturmedium ausgesät und nach Sicherstellen des Wachstums am nächsten Tag mit den zelllinienspezifischen Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren behandelt. Die Verdopplungszeit der Zellen wird mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert und relativ zu der Verdopplungszeit der Kontrollzellen dargestellt (Abbildung 6.31.).

Dabei zeigt sich, dass die Kombination der Inhibitoren wesentlich effizienter in der Proliferationsinhibition der verschiedenen Zelllinien ist, während die Einzelsubstanzen bei der eingesetzten Konzentration noch wirkungslos sind. Für die patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen (Abbildung 6.31. B) ergibt sich eine klare Tendenz bezüglich der Kombination mit Oxamat. Oxamat in Kombination mit DCA führt in allen OC-Zellen zu einem starken wachstumsinhibierenden Effekt, wobei OC_91 <30 µm, OC_91 >30 µm, OC_92, OC_108 und OC_128 eine negative Steigung und damit eine negative Verdopplungszeit aufweisen (= Absterben der Zellen), während OC_38, OC_119 und OC_122 nur stark im Wachstum abgeschwächt sind. Auch die Kombination aus Oxamat und AOA erweist sich als sehr wirkungsvoll. Hierbei zeigen OC_38, OC_91 <30 µm, OC_91 >30 µm, OC_92, OC_108 und OC_128 eine negative Verdopplungszeit, bei OC_119 und OC_122 ist die Verdopplungszeit sehr stark erhöht. Die Kombination aus Oxamat und SB204990 führt bei OC_92 und OC_119 zum Absterben der Zellen, OC_38, OC_91 <30 µm, OC_91 und OC_122 sind stark in ihrer Proliferation inhibiert und OC_108 sind zumindest zeitweise in ihrem Wachstum eingeschränkt. Lediglich OC_128 sind durch die Kombination aus Oxamat und SB204990 in ihrem Wachstum unbeeinflusst. Allerdings scheint nicht jede Kombination mit Oxamat wirkungsvoll zu sein. Oxamat in Kombination mit Etomoxir führt in lediglich der Hälfte der getesteten patientenabgeleiteten Tumorzellen zu einer dauerhaften Wachstumsinhibition.

A		DCA	AOA	Oxamate	SB204990	Etomoxir
OC_38		5mM	1mM	10mM	15µM	40 µM
OC_91<30 µm		5mM	0,6mM	10mM	30µM	40 µM
OC_91>30 µm		2,5mM	0,1mM	10mM	15µM	40 µM
OC_92		5mM	0,1mM	10mM	30µM	40 µM
OC_108		5mM	0,3mM	5mM	30µM	40 µM
OC_119		2,5mM	0,1mM	5mM	30µM	40 µM
OC_122		5mM	0,1mM	10mM	30µM	40 µM
OC_128		5mM	0,1mM	5mM	30µM	40 µM
SKOV-3		2,5mM	0,8mM	10mM	10 µM	80 µM
OVCAR-3		2,5mM	0,3mM	10mM	10 µM	80 µM
IGROV-1		2,5mM	0,3mM	10mM	10 µM	80 µM
HEY		5mM	0,3mM	10mM	10 µM	80 µM
A549		2,5mM	0,3mM	10mM	10 µM	80 µM
HeLa		5mM	0,6mM	10mM	10 µM	80 µM
MCF-7		5mM	1mM	10mM	10 µM	80 µM
MCF-10A		10mM	0,3mM	10mM	10 µM	80 µM

B			OC_38	OC_91 <30 µm	OC_91 >30 µm	OC_92	OC_108	OC_119	OC_122	OC_128
DCA	AOA		0,61	1,82	1,95	0,70	5,67	0,31	0,94	-
DCA	Oxamat		2,21	-	-	-	-	2,98	1,34	-
DCA	SB204990		0,73	1,02	0,95	0,41	3,24	0,97	0,99	0,77
AOA	Oxamat		-	-	-	-	-	9,36	2,95	-
AOA	SB204990		0,55	1,20	0,87	1,26	0,84	1,04	1,65	0,51
Oxamat	SB204990		2,05	1,32	1,21	-	2,19	-	5,83	1,09
Etomoxir	Oxamat		0,89	0,57	1,99	-	2,42	1,29	2,42	0,93
Etomoxir	SB204990		0,94	0,65	0,73	0,36	1,51	0,69	0,93	1,05
Etomoxir	AOA		0,61	0,94	0,64	0,79	0,96	1,02	1,48	0,86

C			SKOV-3	OVCAR-3	IGROV-1	HEY	A549	HeLa	MCF-7	MCF-10A
AOA	Oxamat		67,44	1,57	3,98	0,55	1,53	2,23	1,85	0,99
AOA	SB204990		1,86	2,30	1,40	0,71	2,22	6,77	6,08	1,34
Oxamat	SB204990		2,78	1,35	3,18	1,06	1,19	1,07	1,06	1,32
Etomoxir	AOA		1,42	2,84	1,90	0,71	0,93	1,80	1,42	1,56
Etomoxir	SB204990		0,69	1,84	1,08	1,08	1,14	2,52	1,05	1,92
Etomoxir	Oxamat		1,59	1,52	2,04	0,95	0,96	0,95	1,00	1,38
Etomoxir	DCA		1,07	3,52	0,89	1,06	1,03	1,03	1,08	1,35
SB204990	DCA		1,53	1,37	1,49	1,02	1,22	3,02	1,84	1,16
Oxamat	DCA		3,79	1,28	2,51	0,85	1,01	0,79	0,95	0,80
AOA	DCA		1,10	1,35	1,25	0,73	1,40	1,18	1,70	0,82

Abbildung 6.31. Tabellarische Darstellung der proliferationsinhibitorischen Wirkung unterschiedlicher Kombinationen metabolischer Inhibitoren.

Im Vollmedium werden die Zellen mit individuellen Konzentrationen der unterschiedlichen metabolischen Inhibitoren behandelt und deren Proliferation mit Hilfe des xCELLigence RTCA analysiert. Dabei wurden Konzentrationen gewählt, die gerade noch keine bzw. sehr schwache proliferationsinhibitorische Effekte aufweisen (**A**). In einem geeigneten Zeitraum wird die Verdopplungszeit der OC-Zellen (**B**) und der etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A (**C**) bestimmt und diese relativ zur Verdopplungszeit der Kontrollzellen in diesem Zeitraum dargestellt. Ein Anstieg der Verdopplungszeit um den Faktor 1,2 (=20 %) wurde als Effekt betrachtet und deshalb farbig gekennzeichnet. Dabei stellen hellorange markierte Felder nur eine kurzfristige Wachstumsverzögerung dar, während dunkelorange markierte Felder eine dauerhafte Proliferationsinhibition über mindestens 4 Tage aufweisen. Ist ein Feld mit einem „-“ gekennzeichnet, so war die Verdopplungszeit dieser Zellen unter dieser Konzentration negativ.

Außerdem sind noch weitere Kombinationen an metabolischen Inhibitoren möglich, die aber nicht auf alle OC-Tumorzellen einen Effekt haben. So wirkt die Kombination aus DCA und AOA beispielsweise stark proliferationsinhibitorisch auf OC_128 und auch OC_91 <30 µm und OC_108 sind nachhaltig in ihrer Proliferation gestört, während die übrigen Tumorzellen weitgehend unbeeinflusst bleiben. Die Kombination aus DCA und SB204990 wirkt lediglich auf OC_108 stark proliferationsinhibitorisch und erhöhen die Verdopplungszeit um das 3,24-fache. Die Kombinationen aus AOA und SB204990, Etomoxir und SB204990 und Etomoxir und AOA bewirken in keiner der getesteten Zelllinien eine nachhaltige Proliferationsinhibition.

Für die Gruppe der etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A (Abbildung 6.31. C) ergibt sich ein sehr heterogenes Bild bezüglich der wirkungsvollen Kombinationen. Während die Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3, OVCAR-3 und IGROV-1 durch eine Vielzahl an Inhibitorkombinationen im Wachstum beeinflussbar sind, zeigt die Ovarialkarzinomzelllinie HEY sich als völlig unbeeinflusst durch jegliche Kombination.

Unter Berücksichtigung der Fragestellung welche der etablierten Zelllinien sich als Modell für die patientenabgeleiteten Tumorzellen eignet, würde man in diesem Fall auf eine dieser drei Zelllinien zurückgreifen, da die wirkungsvollen Kombinationen der OC-Zellen auch hier zu einer Inhibition der Proliferation führen. Allerdings sind bei allen drei Zelllinien auch Kombinationen wirksam, die bei den OC-Zellen nicht zu einer Wachstumsverzögerung führen.

A549 und HeLa sind, wenn überhaupt, in den eingesetzten Konzentrationen nur kurzfristig zu beeinflussen. Die Proliferationsinhibition der Brustdrüsenkrebszelllinie MCF-7 scheint hauptsächlich auf die Kombination mit dem Inhibitor des Malat-Aspartat-Shuttles AOA zurückzugehen, während die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A durch jegliche Kombination mit dem Carnitin-Shuttle-Inhibitor Etomoxir in ihrer Proliferation eingeschränkt zu sein scheint.

Die Untersuchung des synergistischen Effekts durch Kombinationen von metabolischen Inhibitoren war zunächst *screenartig* angelegt. Gerade für die Proliferationsinhibition der patientenabgeleiteten OC-Zellen kristallisieren sich drei vielversprechende Kombinationen heraus, die in einem weiteren Experiment verifiziert werden sollten. Dabei wurden die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 als potentiell Modellsystem für weitere Versuche mitgeführt. Die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A wird als Kontrolle für nicht-Tumorzellen ebenfalls untersucht. Außerdem wurden hierfür auch Konzentrationen getestet, die höher als die für diese Zelllinie etablierte Konzentration lagen, wenn diese für eine OC-Zelllinie eingesetzt werden mussten (Abbildung 6.32.), da es für die Entwicklung von

Tumorthérapien Voraussetzung ist, dass nicht-Tumorzellen weitestgehend unbeeinflusst bleiben.

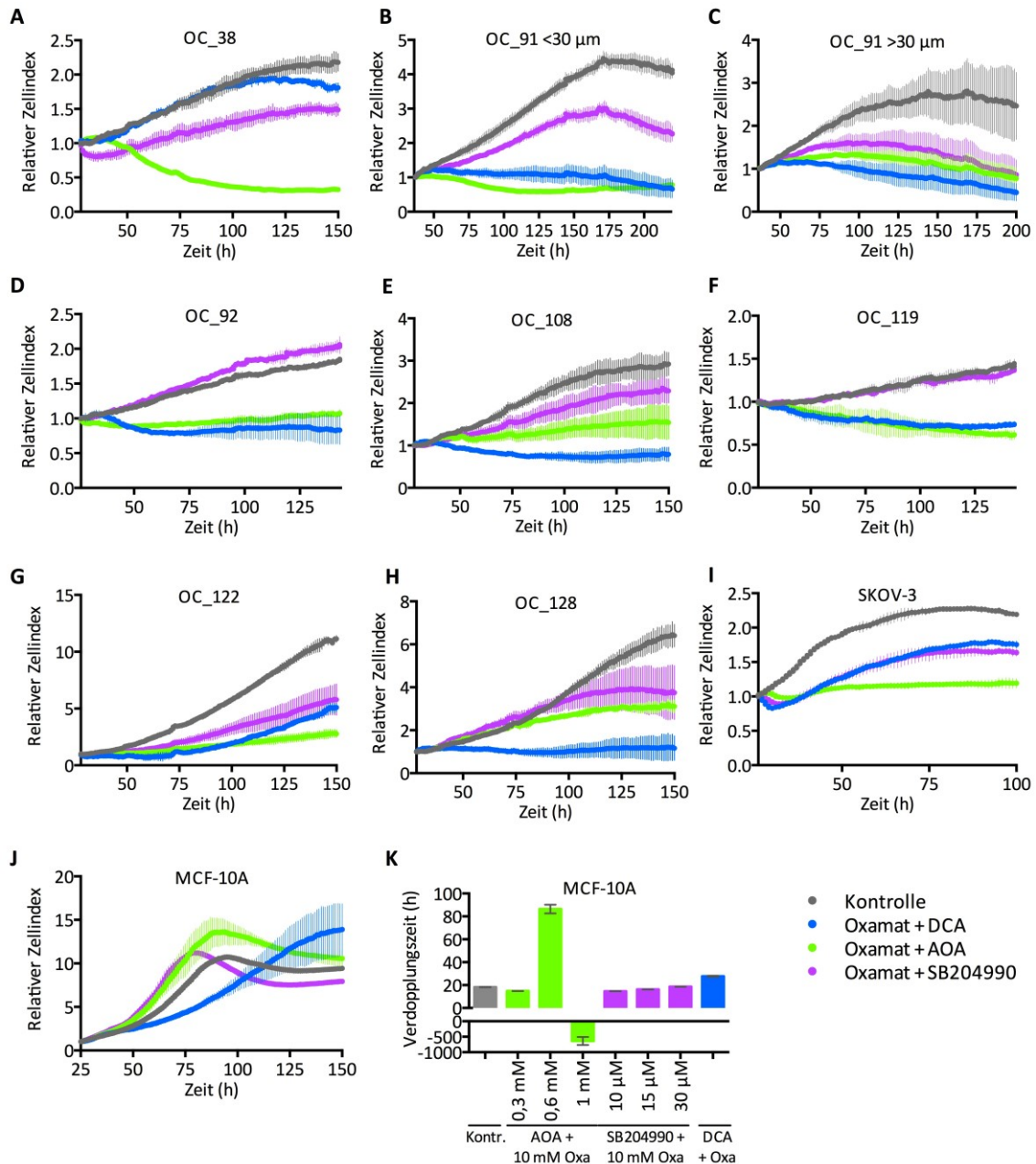


Abbildung 6.32. Beeinflussung des Zellwachstums durch Kombinationen von Inhibitoren im Metabolismus in OC-Zellen, der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A.

A-J) Die Zellen wurden im jeweiligen Kulturmedium ausgesät und am nächsten Tag, nach Sicherstellen des Wachstums, mit den spezifischen Konzentrationen an Inhibitoren behandelt, die alleine keine Wirkung zeigen. Die Impedanz, die durch die Zellen erzeugt wird, wird mit Hilfe des xCELLigence RTCA im Abstand von 30 min gemessen und die relativen Änderungen der Impedanz als Zellindex berechnet. Dargestellt ist der relative Zellindex bezogen auf den Messwert 2 h nach Zugabe der Inhibitoren, angegeben ist der Mittelwert aus Duplikaten. **K)** Für MCF-10A wurden zusätzlich zu den etablierten Konzentrationen, die alleine wirkungslos sind, auch höhere Konzentrationen getestet, wenn diese für die OC-Zellen angewendet wurden, da MCF-10A als nicht-transformierte Zelllinie als Referenz dient. Zu einem geeigneten Zeitpunkt wurde hierbei die Verdopplungszeit der Zellen in h bestimmt.

Anhand des Kurvenverlaufs des relativen Zellindex über die Zeit ist eine Zunahme der Zellzahl in allen Kontrollproben ohne Inhibitor zu verzeichnen. Außerdem lässt sich in allen OC-Zellen die stark proliferationsinhibitorische Wirkung der Kombination von Oxamat und AOA bestätigen und auch die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 weist ein stark eingeschränktes Wachstum auf. Im Gegensatz dazu bleibt die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A in der für sie etablierten Konzentration an AOA im Wachstum völlig unbeeinflusst. Betrachtet man allerdings höhere Konzentrationen an AOA, wie sie für die Zellen OC_38 (1 mM) und OC_91 $<30\ \mu\text{m}$ (0,6 mM) eingesetzt wurden, so zeigt sich auch für die MCF-10A Zellen eine deutliche Erhöhung der Verdopplungszeit bei 0,6 mM, bis hin zum Absterben der Zellen bei 1 mM.

Ebenfalls lässt sich der proliferationsinhibitorische Effekt der Kombination aus Oxamat und DCA in allen OC-Zelllinien, abgesehen von OC_38, bestätigen. Diese Kombination führt zum Absterben der Zellen OC_91 $<30\ \mu\text{m}$, OC_91 $>30\ \mu\text{m}$, OC_92, OC_108, OC_119 und OC_128 im beobachteten Zeitraum. OC_122 weist eine starke Wachstumsinhibition auf, allerdings beginnen diese Zellen ca. 50 h nach Zugabe der Inhibitoren wieder zu wachsen. Bezüglich der OC_38 Zellen ist anfangs keine Beeinflussung der Proliferation durch Oxamat und DCA zu verzeichnen, allerdings ist ca. 100 h nach Zugabe der Inhibitoren in dieser Probe das Plateau erreicht, während die Kontrollzellen noch einen höheren Zellindex im beobachteten Zeitraum erreichen. Auch die Zelllinie SKOV-3, die als potentiell Modellsystem etabliert werden soll, zeigt eine eingeschränkte Proliferation durch die Kombination aus Oxamat und DCA, während die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A, die als Kontrolle dient, nur anfänglich im Wachstum inhibiert ist, später aber sogar einen höheren Zellindex erreicht als die Kontrollprobe ohne Inhibitoren.

Die Effekte, die mit der Kombination aus Oxamat und SB204990 gezeigt wurden, ließen sich nur zum Teil bestätigen. OC_91 $>30\ \mu\text{m}$ weisen tatsächlich einen geringer werdenden Zellindex auf, was für ein Absterben der Zellen spricht, OC_38, OC_91 $<30\ \mu\text{m}$, OC_108, OC_122 und OC_128 sind in der Proliferation gehemmt, ein Wachstum der Zellen ist aber trotzdem noch möglich. Für die Zelllinien OC_92 und OC_119 konnte der proliferationsinhibitorische Effekt nicht bestätigt werden. Die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 ist erwartungsgemäß in ihrem Wachstum inhibiert und die Zellen mit der Kombination aus Oxamat und SB204990 erreichen nicht den Zellindex der Kontrollproben ohne Inhibitor. Die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A zeigt keine Proliferationsinhibition durch diese Inhibitorkombination. Auch hier wurden höhere Konzentrationen an SB204990 getestet, da diese für die OC-Zellen etabliert wurden. Für MCF-10A erhöhen auch höhere Konzentrationen an SB204990 die Verdopplungszeit nicht.

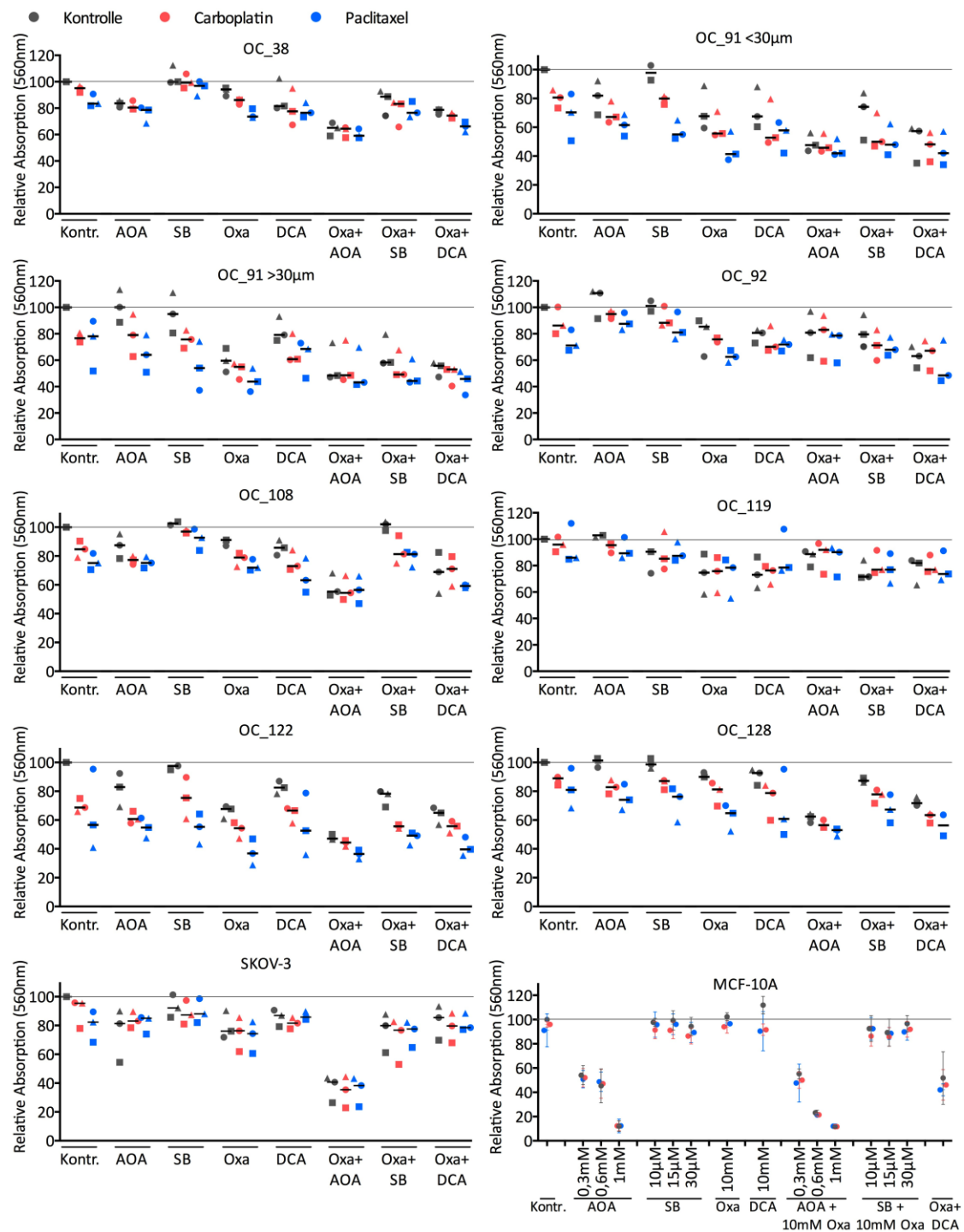


Abbildung 6.33. Überprüfung synergistischer Effekte aus metabolischen Inhibitoren und Chemotherapeutika mittels MTT-Assay in OC-Zellen, der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A.

Die Zellen wurden in ihrem jeweiligen Kulturmedium ausgesät und am nächsten Tag mit den spezifischen Konzentrationen an Inhibitoren behandelt, die allein keine Wirkung zeigten. Zusätzlich wurden entweder keine Chemotherapeutika (grau), 2,5 µM Carboplatin (rosa) oder 2,5 nM Paclitaxel (blau) hinzugefügt. Am 5. Tag nach Behandlung erfolgt die Messung der Absorption bei 560 nm. Die Werte werden jeweils relativ zu der Kontrollprobe ohne Inhibitoren und ohne Chemotherapeutika angegeben. Jedes Symbol stellt den Mittelwert aus biologischen Triplikaten dar, gleiche Symbole kennzeichnen das gleiche Replikat. Horizontale Linien geben den Median aus drei biologischen Replikaten an. MCF-10A dienen als Kontrollzellen für nicht-Tumorzellen. Hier wurden sämtliche Konzentrationen getestet, die zur Behandlung der OC-Zellen eingesetzt wurden. Für MCF-10A Zellen sind übersichtshalber die biologischen Triplikate als ein Datenpunkt mit Standardabweichung zusammengefasst. (SB = SB204990; Oxa = Oxamat)

Wie eingangs beschrieben, konnten Tumorzellen in vielen Fällen durch den Einsatz von Metabolismusinhibitoren für Chemotherapeutika resensitiviert werden, bzw. ein synergistischer Effekt durch deren Kombination erzielt werden. Nachdem ein synergistischer Effekt bezüglich der Kombination verschiedener metabolischer Inhibitoren gezeigt werden konnte, sollte ebenfalls untersucht werden, ob ein synergistischer Effekt der Inhibitoren mit Chemotherapeutika vorliegt. Dazu wurden die Zellen in ihrem jeweiligen Kulturmedium ausgesät und nach Sicherstellen des Anwachsens der Zellen am nächsten Tag mit den unterschiedlichen metabolischen Inhibitoren, einzeln und in Kombination, behandelt. Außerdem wurden zusätzlich entweder 2,5 μ M Carboplatin oder 2,5 nM Paclitaxel hinzugegeben. Dabei wurde auf Chemotherapeutika zurückgegriffen, deren Wirkungsweise auf unterschiedlichen Mechanismen beruht. Carboplatin bildet DNA-Quervernetzungen, verhindert dadurch die Replikation der DNA und führt schließlich zum Zelltod. Paclitaxel wirkt als Mitose-Inhibitor, da es den Abbau der Mitosespindel inhibiert. Für die Chemotherapeutika wurden Konzentrationen gewählt, die allein wenn überhaupt nur einen schwachen Effekt auf das Wachstum der Zellen haben, da hier, wie schon im Versuchsansatz der Inhibitorkombinationen, durch ein Absenken der Konzentrationen eine Schädigung der nicht-Tumorzellen minimiert werden sollte. Das Wachstum der Zellen wurde aufgrund der hohen Probenanzahl mittels MTT-Assay untersucht. Die Messung erfolgt dabei am fünften Tag nach Behandlung. Zusätzlich zu den patientenabgeleiteten Tumorzellen wurden außerdem die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 als mögliches Modellsystem und die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A als Kontrolle für nicht-Tumorzellen mitgeführt. Auch hier wurden in MCF-10A sämtliche Konzentrationen getestet, die zur Behandlung der OC-Zellen eingesetzt wurden

Das Experiment (Abbildung 6.33.) bestätigt im Großen und Ganzen die erwarteten Effekte bezüglich der Inhibitorkombinationen. Lediglich OC_108 weist keine verminderte Zellzahl durch die Kombination von Oxamat und SB204990 im Vergleich zu den Kontrollproben auf. Außerdem fällt auf, dass in diesem Experiment auch durch die Einzelsubstanzen, vor allem bei der Gabe von DCA und Oxamat in fast allen getesteten Tumorzelllinien eine verminderte Zellzahl zu verzeichnen ist. Weiterhin ist festzuhalten, dass bereits kleine Effekte auf das Wachstum der Zellen durch die Behandlung mit den Chemotherapeutika allein auftreten, diese aber durch die zusätzliche Behandlung mit Inhibitoren nicht verstärkt werden.

Somit ist kein synergistischer Effekt von Metabolismusinhibitoren und Chemotherapeutika zu verzeichnen. Allerdings kann ein additiver Effekt beobachtet werden. Zusätzlich fällt auf, dass die Kombination aus Oxamat und AOA allen OC-Zellen, mit Ausnahme von OC_92 und OC_119, zum stärksten proliferationsinhibitorischen Effekt führt. Dieser Effekt ist ohne

Chemotherapeutika in diesen Zellen schon wesentlich stärker als Chemotherapeutika allein und ist auch durch zusätzliche Behandlung mit Chemotherapeutika nicht mehr steigerbar.

In diesem Experiment ist außerdem zu beobachten, dass in MCF-10A Zellen der Inhibitor des Malat-Aspartat-Shuttles AOA bereits in der für diese Zelllinie etablierten Konzentration einen starken Effekt aufweist. Auch die Kombination aus Oxamat und DCA zeigt, anders als erwartet, nach fünf Tagen eine geringere relative Absorption bei 560 nm. Auch in den MCF-10A Zellen konnte kein synergistischer Effekt durch Chemotherapeutika nachgewiesen werden.

6.3 Besonderheiten im Metabolismus der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3

Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe von Dr. Evelyn Schnitzer haben gezeigt, dass sowohl in SKOV-3 Zellen als auch in OC-Zellen *PK4* als wichtiges Schlüsselenzym durch Adhärenzverlust hochreguliert ist. Außerdem geht mit diesem Adhärenzverlust in SKOV-3 Zellen ein gesteigerter glykolytischer Phänotyp einher.

Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden, dass die Simulation der Adhärenz-vermittelten *PK4*-Repression mit Hilfe von DCA sowohl in den SKOV-3 Zellen als auch den primären Tumorzellen die gleichen metabolischen Auswirkungen hat.

Da ein Modellsystem gefunden werden sollte, welches möglichst nahe dem zu untersuchenden System, nämlich den OC-Zellen ist, wurden deshalb die SKOV-3 Zellen zur genaueren Untersuchung herangezogen. Dabei sollte zunächst überprüft werden, ob die von Dr. Schnitzer gezeigte *PK4*-Induktion durch Adhärenzverlust zu einem Anstieg der PDH-Phosphorylierung führt. Dazu wurden die Zellen entweder unter adhärennten Bedingungen auf normalen Zellkulturschalen oder auf Poly-HEMA-beschichteten Zellkulturschalen unter nicht-adhärennten Bedingungen für 24 Stunden kultiviert. Zur Bestätigung der *PK4*-Induktion wurde die Expression von *PK4* mittels RT-qPCR (5.2.2.1.4.) ermittelt (Abbildung 6.34. A). Hierbei zeigte sich eine signifikante, fast 10-fach gesteigerte *PK4*-Expression durch Adhärenzverlust. Weiterhin wurden sowohl Gesamt-PDH also auch der Phosphorylierungszustand der drei Phosphorylierungsstellen S232, S293 und S300 mit Hilfe des Bio-Plex MAGPIX Multiplex Readers (5.2.3.3.) gemessen (Abbildung 6.34. B und C).

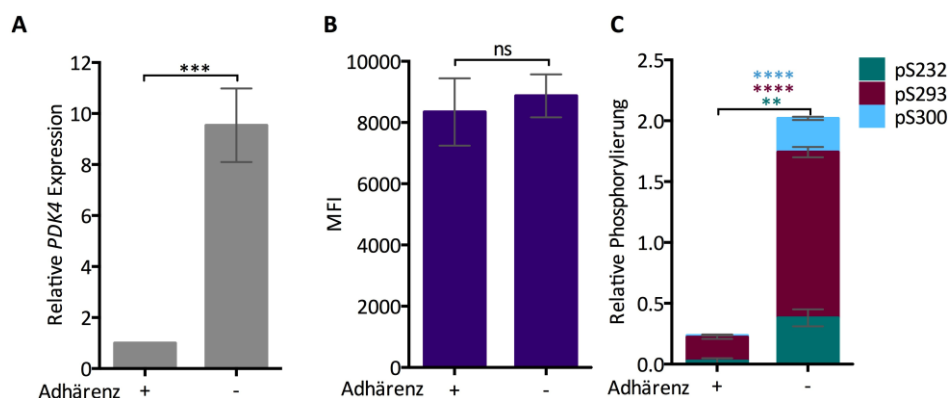


Abbildung 6.34. Auswirkung von Adhärenzverlust auf die *PK4*-Expression und den Phosphorylierungszustand der PDH in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3.

SKOV-3 Zellen wurden entweder auf normalen Zellkulturschalen unter adhärennten Bedingungen (+) oder auf Poly-HEMA-beschichteten Zellkulturschalen unter nicht-adhärennten Bedingungen (-) für 24 Stunden kultiviert. **A)** In der RT-qPCR wurde die relative *PK4*-Expression ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus biologischen Triplikaten. **B)** und **C)** Zusätzlich wurden sowohl Gesamt-PDH (B) als auch der Phosphorylierungszustand der drei Phosphorylierungsstellen S232, S293 und S300 (C) mit Hilfe des Bio-Plex MAGPIX Multiplex Readers gemessen und die Phosphorylierung der unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen bezogen auf die Gesamt PDH-Menge berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus biologischen Triplikaten, gemessen in technischen Triplikaten. Die Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, ns=nicht signifikant

Dabei ist ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung an den drei untersuchten Phosphorylierungsstellen zu erkennen, während die Gesamtmenge an PDH durch Adhärenzverlust unverändert bleibt.

Zusätzlich zu der *PKD4*-Induktion nach Adhärenzverlust ist eine weitere Gemeinsamkeit der patientenabgeleiteten Tumorzellen und der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 der metabolische Effekt von DCA. Wie bereits gezeigt (Abbildung 6.15. und Abbildung 6.16.) bewirkt die Injektion von DCA in beiden Fällen direkt nach der Injektion einen OCR-Anstieg, der sich langsam wieder der Ausgangs-OCR angleicht, während sich die ECAR genau gegenläufig verhält. Dieser Effekt entspricht nicht den Erwartungen, sondern ist eine Besonderheit dieser Zellen. DCA, welches zur Inhibition der PKDs führt, die die PDH inhibitorisch phosphorylieren, sollte demnach zu einer gesteigerten Aktivität der PDH und einer gesteigerten Atmung führen. Um dies genauer darzustellen, wurde der Verlauf von OCR und ECAR im Vergleich zur Lungenkrebszelllinie A549 mittels Seahorse XFe Analyzer gemessen und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 6.35.).

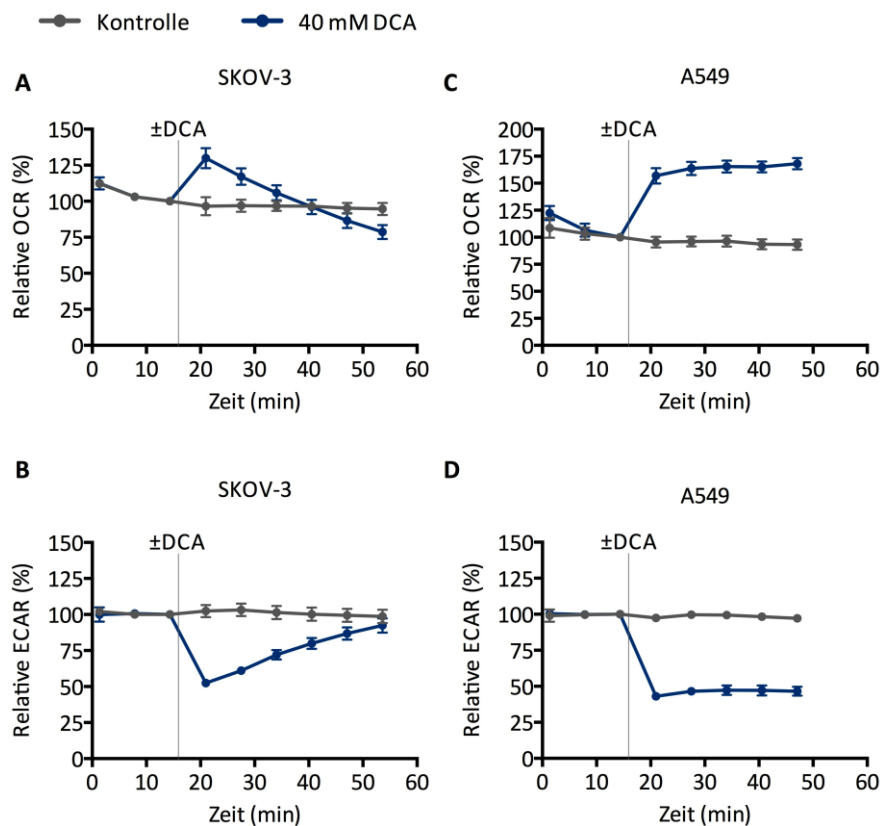


Abbildung 6.35. Metabolische Manipulation der beiden Tumorzelllinien SKOV-3 und A549 durch DCA.

In KHB mit 25 mM Glukose findet für 3 Messpunkte die basale Bestimmung der OCR (A und C) und ECAR (B und D) über die Zeit statt. Anschließend werden 40 μ M DCA bzw. zur Kontrolle das Lösungsmittel injiziert und den Verlauf der metabolische Auswirkung mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Alle Messwerte werden relativ zum Messpunkt 3 vor der Injektion berechnet.

Dabei tritt, wie bereits beschrieben durch die Injektion von DCA im Vergleich zur Kontrollprobe in SKOV-3 Zellen zunächst ein kurzer OCR-Anstieg auf, der über die Zeit wieder abfällt. Bei A549 hingegen steigt durch DCA-Injektion die OCR stark an und bleibt auch stabil erhöht. Ebenso zeigt sich für die ECAR in SKOV-3 Zellen nur ein kurzer Abfall, der sich ebenfalls mit der Zeit wieder dem Ausgangswert angleicht, während für A549 Zellen ein stabiler ECAR Abfall auf 50 % des Ausgangswertes zu verzeichnen ist. Die PDH wird, wie bereits gezeigt (Abbildung 6.13.), jedoch in beiden Fällen durch DCA dephosphoryliert. Dies deutet darauf hin, dass trotz der gesteigerten PDH-Aktivität, das über die Glykolyse entstandene Pyruvat nicht dauerhaft über OXPHOS zur ATP-Gewinnung genutzt werden kann.

Eine weitere metabolische Besonderheit der SKOV-3 Zellen ist die Wirkung von Oxamat. Oxamat hemmt die LDH, sodass kein Laktat mehr gebildet werden kann. Demnach müsste die Injektion von Oxamat zum ECAR-Abfall führen. Da das in der Glykolyse entstandene Pyruvat nicht weiter zu Laktat verstoffwechselt werden kann, wäre anzunehmen, dass es nun im TCA und der Atmungskette über OXPHOS der Energiegewinnung zugeführt wird. Deshalb wäre ein OCR-Anstieg zu erwarten.

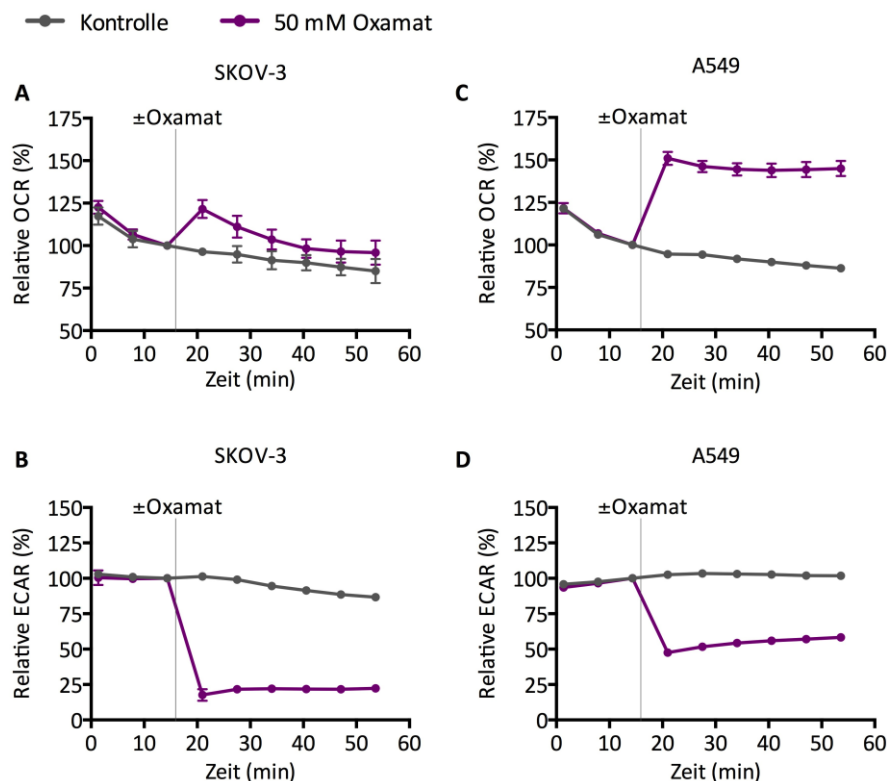


Abbildung 6.36. Metabolische Manipulation der beiden Tumorzelllinien SKOV-3 und A549 durch Oxamat.

In KHB mit 25 mM Glukose findet für 3 Messpunkte die basale Bestimmung der OCR (A und C) und ECAR (B und D) über die Zeit statt. Anschließend werden 50 mM Oxamat bzw. zur Kontrolle das Lösungsmittel injiziert und den Verlauf der metabolischen Auswirkung mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Alle Messwerte werden relativ zum Messpunkt 3 vor der Injektion berechnet.

Um die metabolische Besonderheit der Oxamat-Wirkung der SKOV-3 Zellen im Vergleich zu anderen Zellen abzubilden, wurde Verlauf von OCR und ECAR in KHB mit Glukose im Vergleich zur Lungenkrebszelllinie A549 mittels Seahorse XFe Analyzer gemessen und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 6.36.). Obwohl sowohl in SKOV als auch in A549 die ECAR durch eine LDH-Inhibition deutlich minimiert wird, sind nur A549 zu einer Gegenregulation über eine gesteigerte OCR imstande, während SKOV-3 Zellen erneut nur einen kurzen OCR Anstieg zeigen, der dann aber direkt wieder abfällt.

Auch dieser Befund deutet darauf hin, dass SKOV-3 Zellen Glukose nicht zur ATP-Gewinnung über OXPHOS nutzen, was die Frage aufwirft, ob sie überhaupt dazu in der Lage sind. Mögliche Erklärungen für dieses Phänomen wären ein Defekt der Atmungskette oder ein Problem bei der Weiterleitung von Pyruvat zur weiteren Metabolisierung in den Mitochondrien. Die Möglichkeit eines Defekts in der Atmungskette ist unwahrscheinlich. Obwohl die ATP-Gewinnung aus Glukose mittels OXPHOS nicht möglich zu sein scheint, weisen die SKOV-3 Zellen in vorangegangenen Experimenten dennoch eine hohe Respiration auf. Deshalb deuten die Befunde bislang eher auf einen Defekt im Citratzyklus hin.

Da Glukose allerdings nicht unter Sauerstoffverbrauch metabolisiert wird, stellt sich die Frage, welches Substrat stattdessen in diesen Zellen zur Energiegewinnung verwendet wird. Eine potentielle Substratquelle dieser Zellen könnten endogene Fettsäuren sein, da bereits gezeigte Experimente mit dem Carnitin-Shuttle-Inhibitor Etomoxir auf eine starke Bedeutung der β -Oxidation in diesen Zellen hindeuten. Um diese Vermutung zu untermauern, wurde die metabolische Auswirkung unterschiedlicher Konzentrationen von Etomoxir auf die basale OCR und die ATP-gekoppelte Respiration der beiden Tumorzelllinien SKOV-3 und A549 im KHB mit dem Seahorse XFe Analyzer gemessen (Abbildung 6.37.).

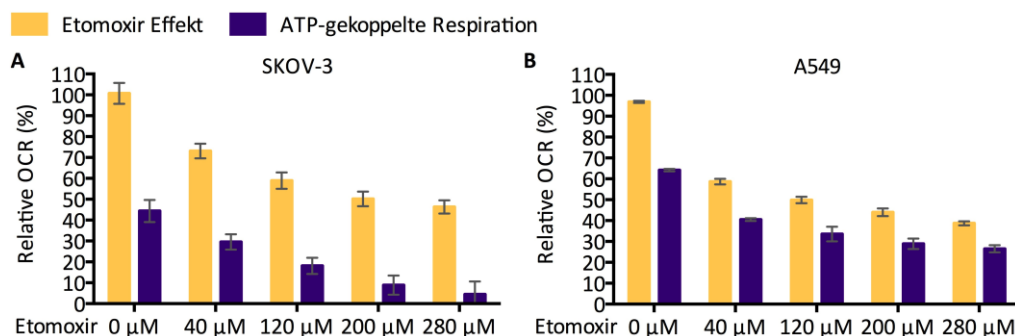


Abbildung 6.37. Metabolische Auswirkung unterschiedlicher Konzentrationen von Etomoxir auf die basale OCR und die ATP-gekoppelte Respiration der beiden Tumorzelllinien SKOV-3 und A549.

In KHB werden unterschiedliche Konzentrationen an Etomoxir injiziert und sowohl die basale OCR als auch die ATP-gekoppelte Respiration 36 min nach Injektion mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers in SKOV-3 Zellen (A) und A549 (B) untersucht. Die Änderungen der basalen OCR werden relativ zu den OCR-Werten vor Injektion von Etomoxir berechnet und als Etomoxir Effekt bezeichnet. Die ATP-gekoppelte Respiration ergibt sich aus der Differenz der OCR vor und nach Injektion von 2 µM Oligomycin und wird ebenfalls relativ zu den OCR-Werten vor Injektion von Etomoxir berechnet.

Der Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen Etomoxir auf die basale OCR ist in beiden Zelllinien vergleichbar. Mit steigenden Konzentrationen an Etomoxir kann die OCR immer weiter gesenkt werden. Vergleicht man jedoch die Menge an Sauerstoff, die in den beiden Zelllinien zur ATP-Generierung (ATP-gekoppelte Respiration) genutzt wird, zeigen sich deutliche Unterschiede. Während in A549 Zellen nach der Blockade der β -Oxidation selbst mit der höchsten Konzentration an Etomoxir noch 30 % der ATP-Produktion mittels OXPHOS erfolgt, ist in SKOV-3 Zellen in diesem Fall keine OXPHOS mehr möglich. Dieser Befund bestätigt die starke Abhängigkeit der SKOV-3 Zellen von der β -Oxidation.

Postuliert man einen TCA-Defekt in den SKOV-3 Zellen aus, so sollte dies auch negative Auswirkungen auf die β -Oxidation haben, es sei denn die Zellen beschreiten einen alternativen Stoffwechselweg. Aufgrund ihrer Stoffwechselkompetenz und enzymatischen Ausstattung sind alle Zellen im Prinzip in der Lage Fett auf- und abzubauen. Denkbar wäre ein bisher nicht in der Literatur beschriebener, zyklischer Ablauf von Fettauf- und Abbau, der FAC (*Fatty Acid Cycle*) (Abbildung 6.38.).

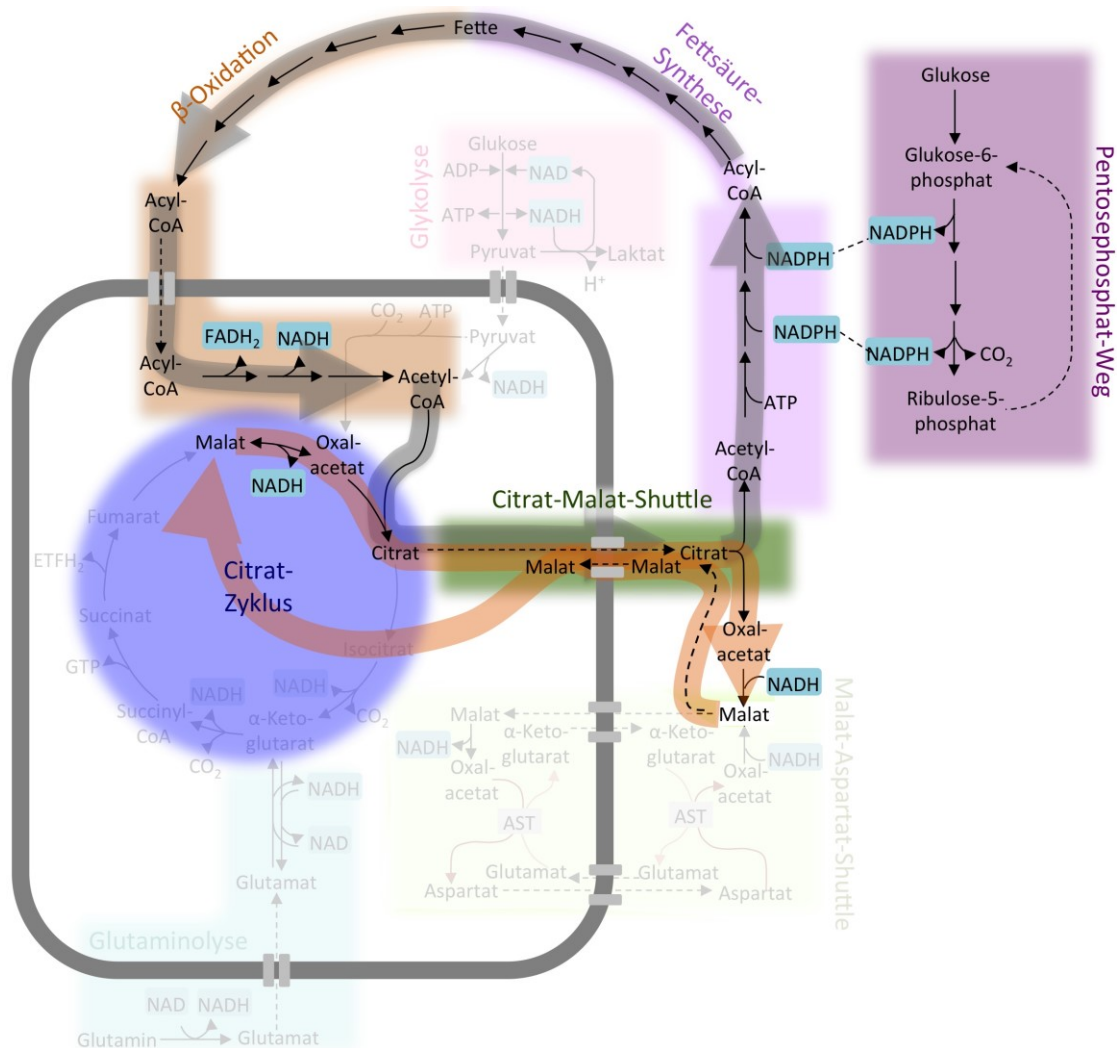


Abbildung 6.38. Schematische Übersichtsabbildung des *Fatty Acid Cycles*

Die detaillierte Beschreibung ist im Text zu finden. (nach einem Entwurf von PD. Dr. Wolfgang Meißner)

Dabei würde das in der β -Oxidation entstehende Acyl-CoA in die Mitochondrien gelangen, wo es unter Entstehung der Reduktionsäquivalente FADH_2 und NADH zu Acetyl-CoA metabolisiert wird. Zusammen mit Oxalacetat wird es anschließend durch die CS zu Citrat kondensiert. Das Citrat wiederum würde durch den Citrat-Malat-Shuttle ins Cytoplasma gelangen und dort wieder durch die ACLY zu Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten werden. Das Acetyl-CoA steht nun wieder zur Fettsäure-Synthese zur Verfügung. Für diesen anabolen Prozess wird NADPH benötigt, welches z. B. aus Glukose im Pentosephosphatweg entsteht. Das aus dem Citrat entstehende Oxalacetat kann im Cytoplasma durch das Enzym Malat-Dehydrogenase unter Verbrauch von NADH zu Malat reduziert werden. Das Malat wird durch einen Antiporter im Austausch gegen ein Citrat wieder ins Mitochondrium transportiert. Hier wird es durch die Malat-Dehydrogenase wieder zu Oxalacetat oxidiert, welches wiederum als Akzeptor für Acetyl-CoA aus der β -Oxidation zur Verfügung steht. Auf diesem Wege gelangt auch im Cytoplasma entstehendes NADH in die Mitochondrien, wo es als Reduktionsäquivalent zusammen mit den Reduktionäquivalenten aus der β -Oxidation in der Atmungskette zur Energiegewinnung über OXPHOS genutzt werden kann.

Nachdem die Bedeutung der β -Oxidation bereits gezeigt wurde, soll nun versucht werden die Wichtigkeit des Fettaufbaus in SKOV-3 Zellen zu untersuchen. Dafür wurde Inhibitor der Thioesterase-Domäne der Fettsäure-Synthase Orlistat verwendet (Abbildung 6.39.). Dadurch dass durch diesen Inhibitor die Palmitat-Bildung blockiert wird, wäre eine Reduktion der OCR zu erwarten, da die Fettreserven, die verbraucht wurden nicht mehr aufgefüllt werden können und damit nicht mehr für die β -Oxidation zur Verfügung stehen.

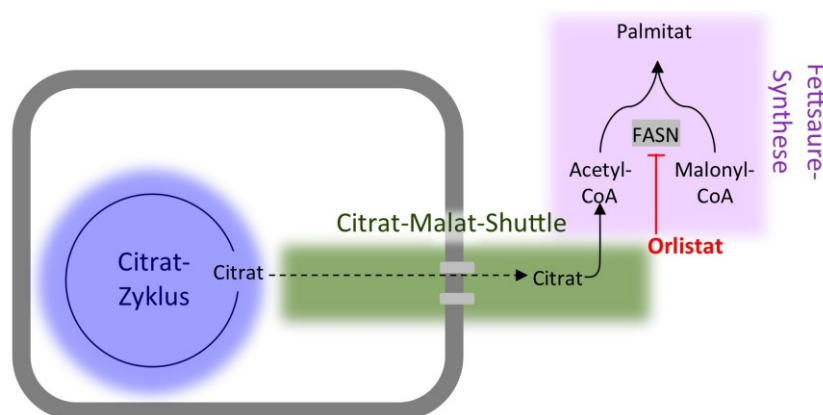


Abbildung 6.39. Übersichtsabbildung über die Wirkung von Orlistat.

Orlistat ist ein Inhibitor der Thioesterase Domäne der Fettsäure-Synthase (FASN) und blockiert damit die Bildung von Fettsäuren, besonders Palmitinsäure aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA.

Zur Untersuchung der Bedeutung des Fettaufbaus für die Zellen wurden diese über Nacht mit Orlistat behandelt und anschließend die Parameter OCR und ECAR mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers in KHB und KHB mit Glukose bestimmt (Abbildung 6.40.). Durch die Blockade der Fettsäure-Synthase ist die OCR der Zellen in beiden Medien deutlich gesenkt, während die ECAR unverändert bleibt. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Fettsäure-Synthase für die Aufrechterhaltung der Energiegewinnung notwendig ist. Eine Rest-OCR ist jedoch immer noch vorhanden. Grund dafür könnte sein, dass die Orlistat-Behandlung nicht lange genug war, um das vorhandene Fett-Depot abzubauen.

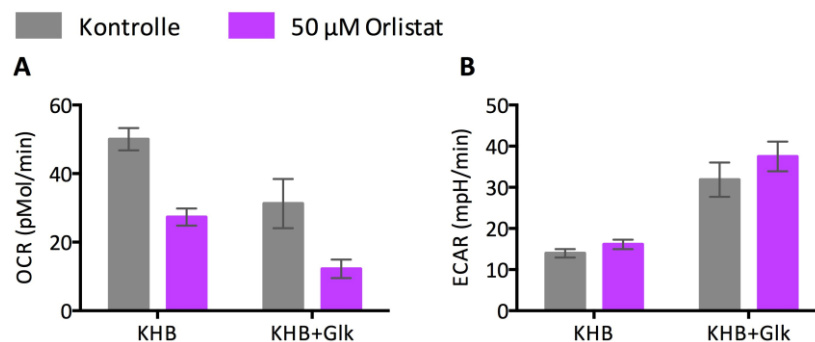


Abbildung 6.40. Auswirkungen auf OCR und ECAR von Orlistat-Behandelten SKOV-3 Zellen.

SKOV-3 Zellen wurden im Vollmedium über Nacht mit 50 µM Orlistat oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt und OCR (A) und ECAR (B) mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers in KHB und KHB mit 25 mM Glukose (KHB+Glk) gemessen.

Um den postulierten FAC ablaufen zu lassen, ist außerdem die ATP-Citrat-Lyase von großer Bedeutung. Diese sorgt nicht nur für die Bereitstellung von Acetyl-CoA für die Fettsäure-Synthese, sondern durch die Umwandlung von Oxalacetat in Malat und dessen Rücktransport ins Mitochondrium gelangt auch NADH vom Cytoplasma in das Mitochondrium, wo es als Reduktionsäquivalent für die OXPHOS zur Verfügung steht und dadurch zur Energiegewinnung beitragen kann. Die Bedeutung der ACLY soll in SKOV-3 Zellen im Vergleich zu A549 Zellen im Seahorse XFe Analyzer mit Hilfe des ACLY-Inhibitors SB204990 untersucht werden (Abbildung 6.41.). Dazu wird zunächst die basale OCR und ECAR bestimmt und die Änderungen dieser Parameter nach der Injektion von SB204990 relativ zu Messpunkt 3 vor Injektion berechnet. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass durch die Inhibition der ACLY in den SKOV-3 Zellen die OCR deutlich absinkt, während die ECAR als Gegenregulation ansteigt. Bei den A549 Zellen hingegen steigt die OCR nach SB204990 Injektion kurz an, fällt dann aber wieder leicht ab, während die ECAR unverändert bleibt.

Eine Reaktion auf eine Blockade der Fettsäure-Synthase wäre aufgrund des Fettdepots in den Zellen erst nach einiger Zeit zu erwarten. Die kurzfristige metabolische Reaktion der SKOV-3 Zellen auf die Blockade der ACLY könnte dadurch begründet sein, dass in der Glykolyse

anfallendes NADH nach Inhibition des Citrat-Malat-Shuttles nicht mehr in die Mitochondrien gelangen kann, wo es üblicherweise über die OXPHOS zur Energiegewinnung genutzt wird. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde ein weiterer Weg auf dem NADH in das Mitochondrium gelangen kann betrachtet. Dieser ist der Malat-Aspartat-Shuttle (vgl. 4.4.5.).

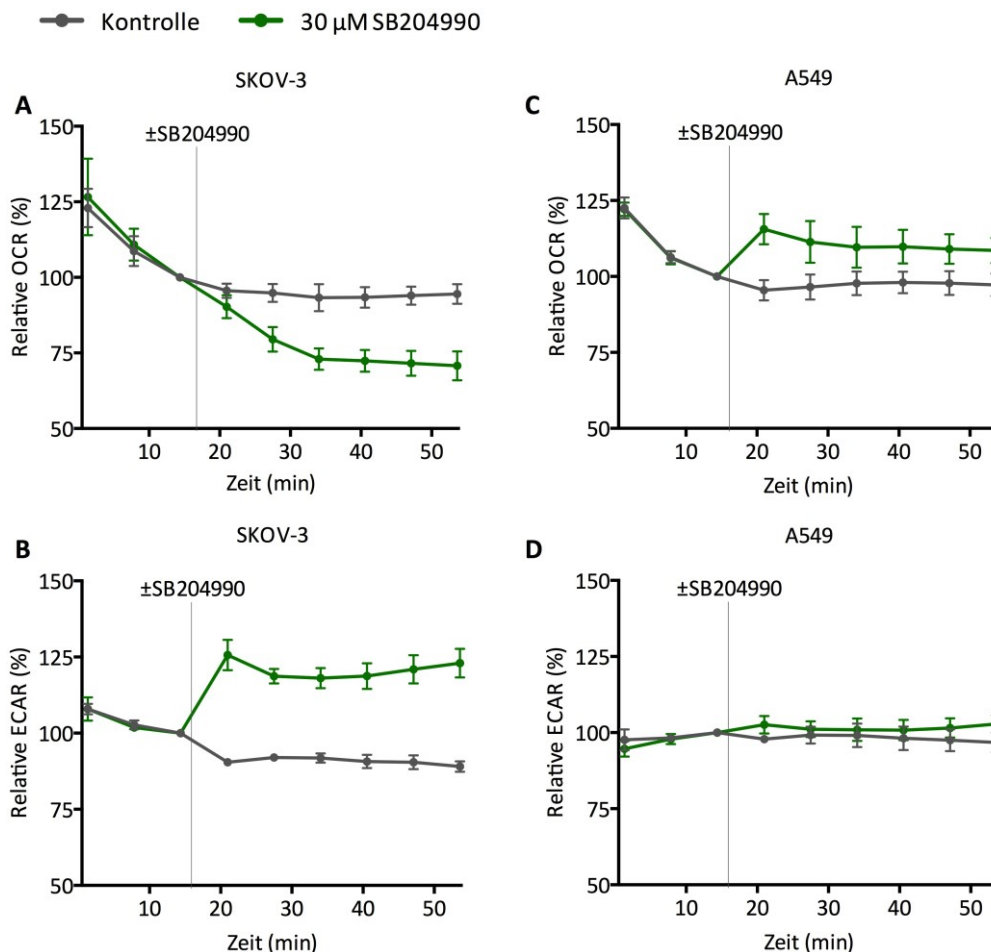


Abbildung 6.41. Metabolische Manipulation der beiden Tumorzelllinien SKOV-3 und A549 durch SB204990.

In KHB mit 25 mM Glukose findet für 3 Messpunkte die basale Bestimmung der OCR (A und C) und ECAR (B und D) über die Zeit statt. Anschließend werden 30 µM SB204990 bzw. zur Kontrolle das Lösungsmittel injiziert und den Verlauf der metabolischen Auswirkung mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Alle Messwerte werden relativ zum Messpunkt 3 vor der Injektion berechnet.

Um die Bedeutung dieses Shuttles zu untersuchen, wurde AOA, ein Inhibitor der Aspartat-Transaminase verwendet. Nach Bestimmung der basalen Parameter OCR und ECAR mittels Seahorse XFe Analyzer wurde der Inhibitor injiziert und die Veränderung von OCR und ECAR relativ zu Messpunkt 3 vor der Injektion für die Zelllinien SKOV-3 und A549 berechnet. Des Weiteren wurde die ATP-gekoppelte Respiration (OCR nach Oligomycin-Injektion) und die glykolytische Kapazität (ECAR nach Oligomycin-Injektion) durch die Injektion von Oligomycin ermittelt (Abbildung 6.42.).

Durch die Injektion von AOA zeigt sich in den SKOV-3 Zellen eine starke Reduktion der OCR auf ca. 40 % der basalen OCR. Die Oligomycin-Injektion zeigt, dass nach AST-Inhibition nur noch 15 % der basalen OCR zur ATP-Produktion genutzt werden. Die Blockade des Malat-Aspartat-Shuttles in den A549 Zellen hingegen weist nur eine Reduktion der OCR auf ca. 80 % der basalen OCR auf und auch nach Blockade des Shuttles werden noch 50 % der basalen OCR zur ATP-Produktion genutzt. Auch bezüglich der ECAR sind große Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien festzustellen. Durch die Injektion von AOA steigt die ECAR in den SKOV-3 Zellen um ca. 40 % an, während in den A549 Zellen nur ein Anstieg von knapp 9 % zu verzeichnen ist. Durch die Zugabe von Oligomycin wird schließlich die glykolytische Kapazität der Zellen nach Blockade des Malat-Aspartat-Shuttles untersucht. Für die SKOV-3 Zellen ist nach AOA Injektion keine glykolytische Reservekapazität mehr vorhanden, während in den A549 die ECAR nach Oligomycin-Injektion um weitere 30 % ansteigt. Das bedeutet, dass in SKOV-3 Zellen nach Blockade des Shuttles die ECAR bereits am Maximum angelangt und selbst nach Inhibition der ATP-Synthase nicht mehr steigerbar ist. Dieser Versuch zeigt die große Bedeutung des Malat-Aspartat-Shuttles in den SKOV-3 Zellen im Vergleich zu A549 Zellen.

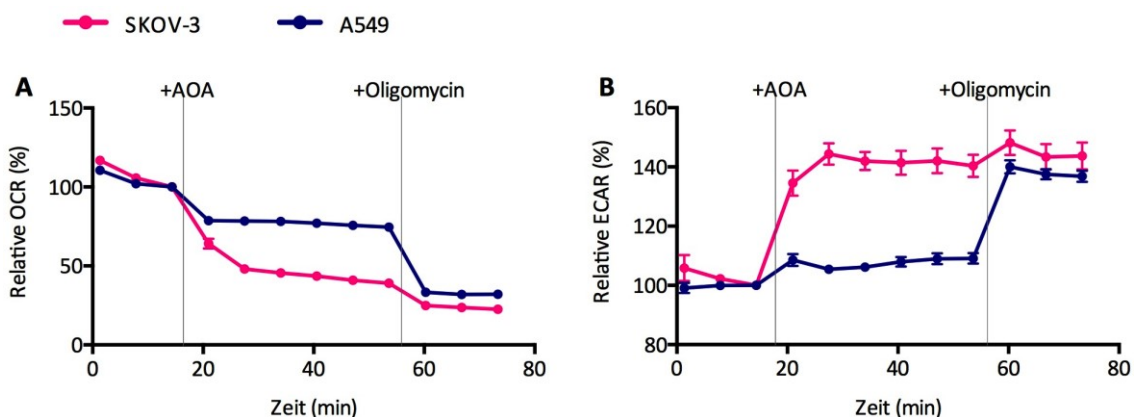


Abbildung 6.42. Metabolische Manipulation der beiden Tumorzelllinien SKOV-3 und A549 durch AOA. In *low-buffered* DMEM mit 2 mM Glutamin und 25 mM Glukose und findet für 3 Messpunkte die basale Bestimmung der OCR (A) und ECAR (B) über die Zeit statt. Anschließend werden 300 μ M AOA injiziert und den Verlauf der metabolischen Auswirkung mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers untersucht. Alle Messwerte werden relativ zum Messpunkt 3 vor der Injektion berechnet. Nach 6 weiteren Messpunkten erfolgt die Injektion von 2 μ M Oligomycin, um sowohl die ATP-gekoppelte Respiration (A nach Oligomycin Injektion) als auch die glykolytische Kapazität (B nach Oligomycin Injektion) zu ermitteln.

Alle bisher gezeigten Daten deuten auf einen Defekt des Citratzyklus und das Ablaufen eines alternativen Weges hin. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, wo der Defekt im Citratzyklus liegt. Um dies zu untersuchen, wurden metabolische ^{13}C -Stoffflussanalysen durchgeführt. Dabei wurde den Zellen an Stelle von unmarkierter Glukose bzw. unmarkiertem Glutamin 1,2- $^{13}\text{C}_2$ Glukose oder U- ^{13}C Glutamin im Medium zugeführt und die Produktion verschiedener

markierter Metabolite mittels GC/MS gemessen. Aus $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ Glukose entsteht ein 2-fach markiertes und ein unmarkiertes Pyruvat (Abbildung 6.43.). Gelangt dieses in das Mitochondrium und wird weiter zu Citrat metabolisiert, erhält man wiederum ein 2-fach markiertes und ein unmarkiertes Citrat, welches wiederum zu einem 2-fach markierten und einem unmarkierten α -Ketoglutarat wird. Weiterhin kann daraus 2-fach bzw. unmarkiertes Malat in der ersten Runde des Citratzyklus entstehen. Außerdem entsteht aus $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ Glukose über 3-Phosphoglycerat 2-fach bzw. unmarkiertes Serin und über Pyruvat 2-fach bzw. unmarkiertes Laktat. Gibt man den Zellen $\text{U-}^{13}\text{C}$ Glutamin als Substrat, so würde man die Bildung von 5-fach markiertem Glutamat und daraus 5-fach markiertem α -Ketoglutarat erwarten. Aus einem M5 (ein Molekül mit 5 schweren Isotopen) Glutamat kann außerdem ein M4 Aspartat entstehen. Ein M5 α -Ketoglutarat wird im Citratzyklus weiter zu M4 Malat und M4 Citrat metabolisiert. Außerdem ist aus M4 Malat die Bildung von M3 Pyruvat und M3 Laktat möglich. Die Untersuchung der ^{13}C -Stoffflussanalyse findet zusätzlich zu den SKOV-3 Zellen und der bisher als Kontrollzelle dienenden Lungenkarzinomzelllinie A549 auch in der nicht-transformierten Brustdrüsenzelllinie MCF-10A statt, um einen Vergleich zu nicht-Tumorzellen zu erhalten.

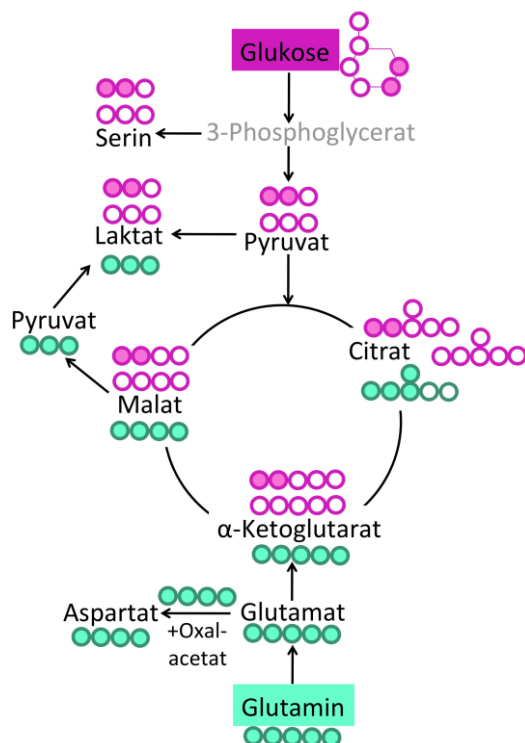


Abbildung 6.43. Übersichtsabbildung über das Markierungsmuster von $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ Glukose oder $\text{U-}^{13}\text{C}$ Glutamin abgeleiteten Metaboliten im Citratzyklus.

Die pink dargestellten Metabolite entstehen aus $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ Glukose, während die türkis gefärbten Metabolite von $\text{U-}^{13}\text{C}$ Glutamin abgeleitet sind. Ausgefüllte Kreise stellen markierte C-Atome dar, nicht ausgefüllte Kreise unmarkierte. Die genaue Beschreibung ist im Text zu finden.

Die ^{13}C -Stoffflussanalyse mit $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ Glukose zeigt eine leichte Zunahme an ^{13}C -markiertem Serin in den Zelllinien SKOV-3 und A549, wohingegen dies in MCF-10A Zellen nicht der Fall zu sein scheint (Abbildung 6.44.). Des Weiteren ist in allen drei Zelllinien eine eindeutige Zunahme an M2 und M3 Pyruvat und Laktat zu verzeichnen, während dieses nicht aus U- ^{13}C Glutamin gebildet wird. Ebenso ist die Bildung von markiertem Citrat zu verzeichnen. Die Bildung von markiertem α -Ketoglutarat und Malat aus $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ Glukose ist nicht eindeutig zu belegen.

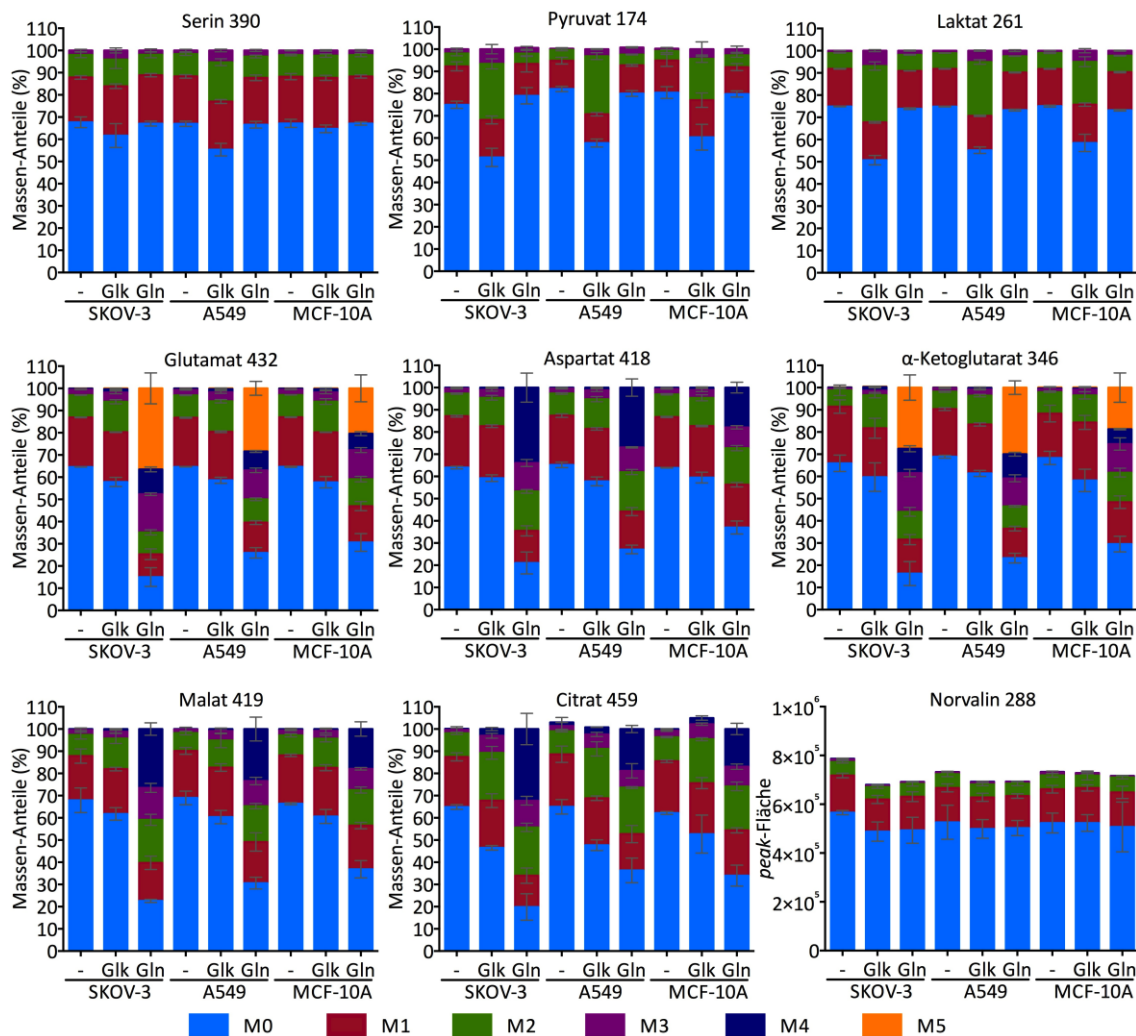


Abbildung 6.44. Massenverteilung von ^{13}C markierten Substraten im Stoffwechsel der Tumorzelllinien SKOV-3 und A549 und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A.

Die Zellen wurden nach deren Anheftung in KHB mit 5 mM HEPES, 20 mM Glukose, 2 mM Glutamin und 2 mM Pyruvat für 20 h kultiviert, wobei entweder alle Substrate unmarkiert (-) oder $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ Glukose (Glk) oder U- ^{13}C Glutamin (Gln) anstelle des unmarkierten Substrats im Medium enthalten war. Nach GC/MS werden die Massen-Anteile relativ zu der Summe aller detektierten Massen berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier biologischen Replikaten der Analyte Serin (m/z 390), Pyruvat (m/z 174), Laktat (m/z 261), Glutamat (m/z 432), Aspartat (m/z 418), α -Ketoglutarat (m/z 346), Malat (m/z 419) und Citrat (m/z 459). Außerdem wurde die absolute Verteilung der *peak*-Flächen von Norvalin (m/z 288), welches als interner Standard dient, dargestellt.

Ist U-¹³C Glutamin im Medium der Zellen vorhanden, ist die Markierung der Metabolite wesentlich eindeutiger. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass bis zu 5-fach markiertes Glutamat entsteht, ebenso wie bis zu 5-fach markiertes α -Ketoglutarat. Weiterhin ist in allen drei getesteten Zelllinien bis zu 4-fach markiertes Malat und Citrat zu detektieren. Außerdem entsteht wiederum in allen drei Zelllinien aus M5 Glutamat M4 Aspartat. Norvalin wird als interner Standard mitgeführt und weist innerhalb der Proben keine maßgeblichen Unterschiede auf.

Die ¹³C-Stoffflussanalyse mit 1,2-¹³C₂ Glukose lässt keine genauen Rückschlüsse darauf zu, wo ein potentieller Defekt im Citratzyklus liegen könnte, während die Ergebnisse mit U-¹³C Glutamin zeigen, dass ab α -Ketoglutarat der Citratzyklus problemlos abzulaufen scheint. Denkbar wäre also ein Defekt zwischen Citrat und α -Ketoglutarat. Die beiden potentiell betroffenen Enzyme könnten demnach Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase sein. Da vorangegangene Untersuchungen des Expressionslevels dieser beiden Enzyme keinerlei Auffälligkeiten zeigten, wurde eine Messung der Enzymaktivität durchgeführt (5.2.3.2.). Diese fand im Vergleich zu den übrigen verwendeten etablierten Zelllinien statt, da kein Referenzwert vorliegt. Außerdem fand eine Normalisierung auf die Aktivität des Enzyms Citrat-Synthase statt, um Zellzahlunterschiede auszugleichen, da hier von einer einheitlichen Aktivität ausgegangen wird (persönliche Mitteilung Dr. Oliver Stehling) (Abbildung 6.45.).

Die colorimetrische Bestimmung der Aktivität der NAD⁺-abhängigen IDH zeigt in allen untersuchten Zelllinien eine sehr niedrige Aktivität, die auch keine großen Unterschiede zwischen den Zelllinien aufweist. Die Aktivität der NADP-abhängigen IDH ist in SKOV-3 Zellen relativ gering, aber in Zellen, die nicht die beschriebenen metabolischen Besonderheiten aufweisen (z.B. A549 und MCF10A), u.U. geringer. Auch anhand der Aktivität der ACO ist der potentiell defekte TCA-Zyklus der SKOV-3 Zellen nicht erklärbar, da diese sich bei den SKOV-3 Zellen im Vergleich zu den übrigen Zellen im gleichen Bereich bewegt. Für den Fall, dass sich Aktivitätsunterschiede für IDH und ACO der SKOV-3 Zellen im Vergleich zu den übrigen Zellen zeigen, sollte die Aktivität der Enzyme SDH und COX als Nachweis dienen, dass nicht eine unterschiedliche Zellzahl für diese Unterschiede verantwortlich ist, da für diese Enzyme in allen Zelllinien eine nicht veränderte Aktivität zu erwarten ist. Erwartungsgemäß zeigen sich auch in diesen Enzymen keine starken Aktivitätsunterschiede, die die vorhandenen Effekte erklären würden. Die LDH Aktivität, die eigentlich nur im Cytoplasma nachweisbar sein sollte und nicht in der Membranfraktion, welche für die Messung verwendet wurde, ist ein Maß für die Qualität der Fraktionierung. Bei den SKOV-3 Zellen enthält die Membranfraktion mit Abstand die größte LDH-Menge. Da sich IDH und ACO sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma

befinden, ist aufgrund der Cytoplasma-Verunreinigung der SKOV-3 Probe die Aktivität beider Enzyme möglicherweise niedriger als gemessen einzuschätzen.

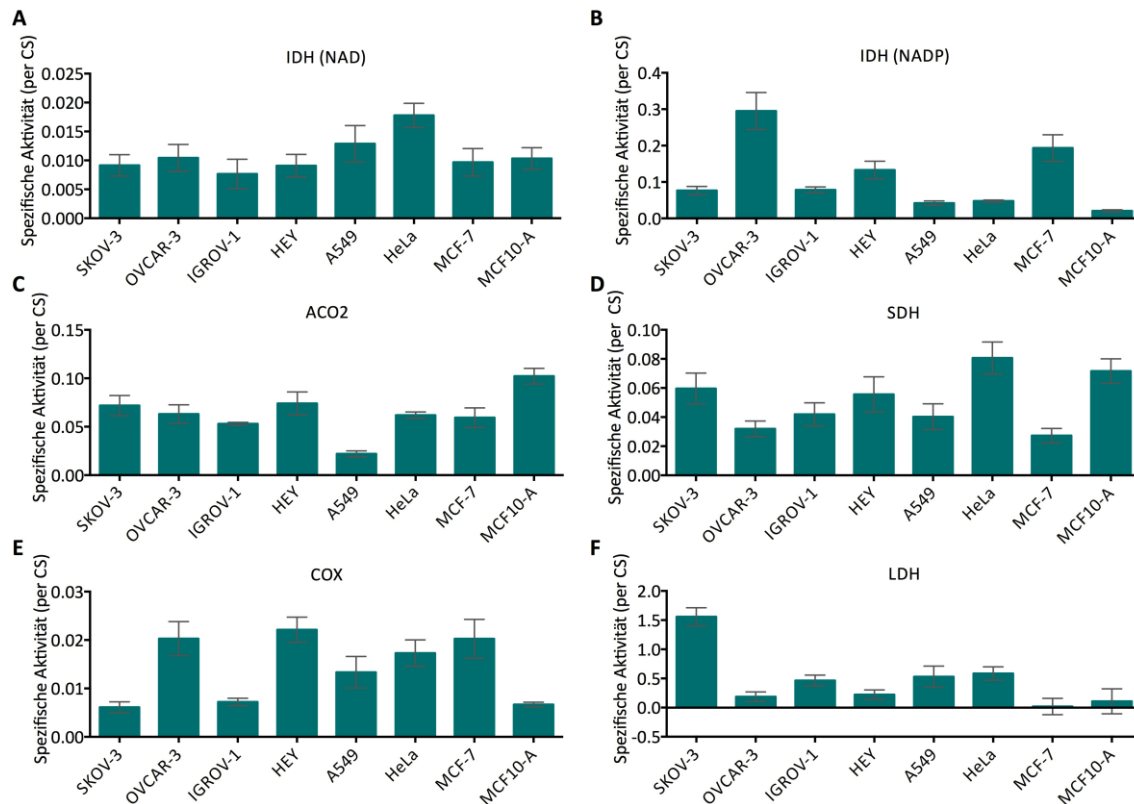


Abbildung 6.45. Enzymaktivitätsmessung in etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A.

Standardmäßig kultivierte Zellen wurden geerntet und die Aktivität der Enzyme Isocitrat-Dehydrogenase (IDH; NAD oder NADP abhängig), Aconitase (ACO2), Succinat-Dehydrogenase (SDH), Cytochrom-c-Oxidase (COX) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) photometrisch gemessen und auf die Aktivität des Enzyms Citrat-Synthase (CS) normalisiert.

Anhand der Messung der Enzymaktivitäten von ACO und IDH kann ein TCA-Defekt nicht nachgewiesen werden. Auch ^{13}C -Stoffflussanalysen mit 1,2- $^{13}\text{C}_2$ Glukose lassen keine genauen Rückschlüsse zu, wo der Defekt liegen könnte. Es stellt sich also die Frage, wie der spezielle Stoffwechsel der SKOV-3 Zellen dann zu erklären ist.

Experimente, in denen SKOV-3 Zellen nach der DCA-Injektion Pyruvat injiziert wurde, geben erste Hinweise (Abbildung 6.46.). Hierbei wurde nach Bestimmung der basalen OCR im KHB DCA bzw. als Kontrolle Medium injiziert. Anschließend wird beiden Proben 2 mM Pyruvat injiziert und der Effekt auf die OCR mittels Seahorse XFe Analyzer dokumentiert.

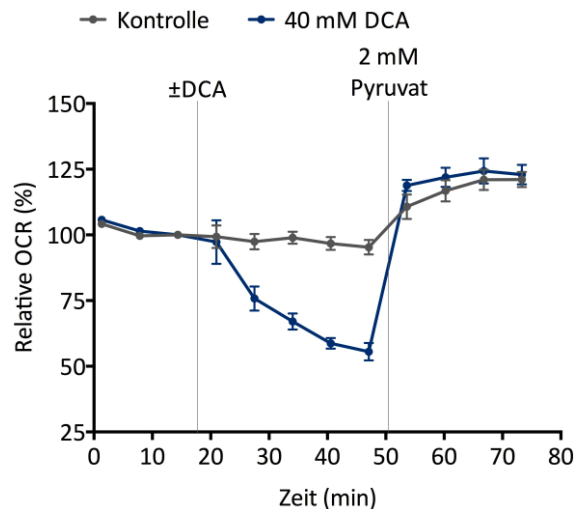


Abbildung 6.46. Metabolische Auswirkung der Pyruvat-Injektion nach DCA-Gabe in SKOV-3 Zellen.

In KHB findet für 3 Messpunkte die basale Bestimmung der OCR über die Zeit mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers statt. Anschließend erfolgt die Injektion von 40 mM DCA oder als Kontrolle des Lösungsmittels und die Dokumentation des zeitlichen Verlaufs. Nach weiteren 5 Messpunkten werden 2 mM Pyruvat injiziert und der Verlauf für 4 weitere Zeitpunkte dokumentiert.

Durch die Zugabe von DCA sinkt die OCR, wie bereits schon im KHB mit Glukose gezeigt, deutlich ab. Diesmal entsteht kein kurzer OCR-Anstieg, da die Messung im KHB stattfindet. Durch die Zugabe von 2 mM Pyruvat steigt nach DCA-Gabe die OCR deutlich an und zwar auf das gleiche Niveau wie die OCR der Kontrollzellen ohne DCA. Dies deutet nicht unbedingt auf einen TCA-Defekt hin. Pyruvat kann nach DCA-Gabe über OXPHOS metabolisiert werden, aber die DCA-Injektion, ohne dass Pyruvat gegeben wird, führt nur zu einem OCR-„peak“.

Betrachtet man die Regulation der PDH (Abbildung 6.47.), so wird deutlich, dass Pyruvat inhibierend auf die PDKs wirkt, welche wiederum die PDH inhibierend phosphorylieren. Eine Aktivierung der PDH wäre damit also zu erklären. Aber auch der Inhibitor DCA hat eine aktivierende Wirkung auf die PDH, indem es die PDKs inhibiert und damit nachweislich zur Dephosphorylierung führt. Demnach wäre zu erwarten, dass der Verlauf der OCR durch Pyruvatzugabe oder DCA-Gabe gleich ist. Allerdings bleibt nach Pyruvat-Injektion die OCR auf dem höheren Level und sinkt nicht wieder ab, wie es bei DCA der Fall ist.

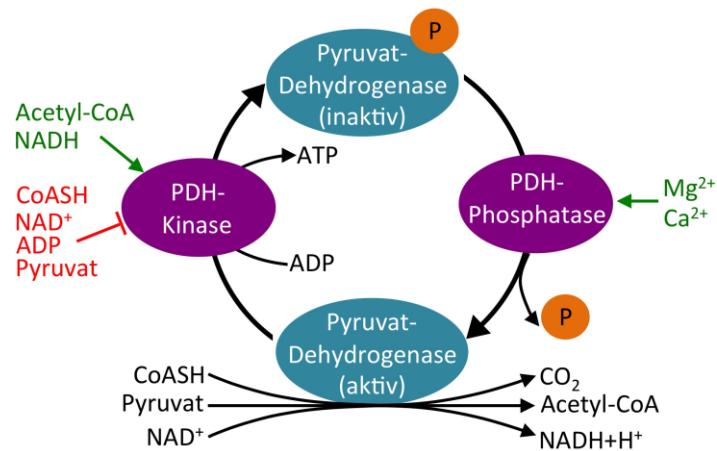


Abbildung 6.47. Übersichtsabbildung zur Regulation der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)

Die PDH ist im phosphorylierten Zustand inaktiv und wird durch die Dephosphorylierung der PDPs (Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatasen) aktiviert. In diesem Zustand katalysiert sie die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA unter der Freisetzung von CO_2 . Außerdem wird bei der Reaktion NAD^+ zu NADH reduziert. Durch die Phosphorylierung der PDKs (Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen) findet wieder eine Inaktivierung des PDCs statt. Eine Aktivierung der PDKs erfolgt durch die Produkte der PDC-Reaktion, während Substrate die Aktivität senken. Mg^{2+} und Ca^{2+} führen zur Aktivierung der PDPs. (Modifiziert nach Jeoung & Harris, 2010)

RNA-Sequenzierungs-Daten dieser Arbeitsgruppe (Abbildung 6.48.) weisen darauf hin, dass die Expression des Gens MPC1 in SKOV-3 Zellen im Vergleich zu unterschiedlichen primären Zellen deutlich unterrepräsentiert ist. Dies ist ein Teil des MPC1/MPC2 Heterodimers, welches für den Transport von Pyruvat in das Mitochondrium verantwortlich ist.

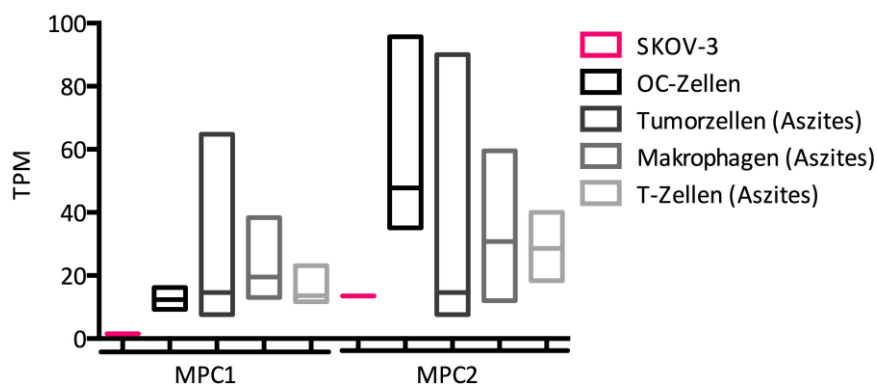


Abbildung 6.48. Vergleich der Expression der Gene des Mitochondrialen Pyruvat Transporters (Auszug aus RNA-Sequenzierung).

Dargestellt sind die Expressionslevel (TPM= transcripts per million) der Gene des Mitochondrialen Pyruvat-Transporters *MPC1* und *MPC2* in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 im Vergleich zu OC-Zellen sowie Tumorzellen, Makrophagen und T-Zellen, die aus Aszites isoliert wurden. Makrophagen und T-Zellen dienen dabei als Vergleich für nicht-Tumorzellen. (Daten publiziert in Rohnalter et al. 2015; Reinartz et al. 2016)

Festzuhalten bleibt demnach, dass mit Glukose als Substrat, welches nur physiologische Konzentrationen an Pyruvat produziert, eine Steigerung der OCR durch die Inhibitoren Oxamat oder DCA niemals beobachtet werden konnte. Unphysiologisch hohe Konzentrationen an Pyruvat führen allerdings zum OCR-Anstieg nach DCA-Gabe. Der Mechanismus, wie das Pyruvat im Mitochondrium unter diesen Umständen zur Energiegewinnung über OXPHOS genutzt werden kann, muss in zukünftigen Experimenten noch geklärt werden.

7 Diskussion

Nachdem Ansätze der Krebstherapie, die auf Zellteilung, Angiogenese und Oberflächenrezeptoren abzielen zu keinem durchschlagenden Erfolg geführt haben, gilt die Manipulation des Stoffwechsels von Tumorzellen als ein neuer Ansatzpunkt. Für die Entwicklung solcher zielgerichteter Therapien müssen die Metabolismus-spezifischen Charakteristika der Krebszellen genau untersucht und individuelle Präferenzen der Stoffwechselwege herausgearbeitet werden. Im Fokus dieser Arbeit stand deshalb die metabolische Charakterisierung von OC-Zellen im Vergleich zu etablierten Tumorzelllinien und der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A. Außerdem sollte versucht werden, anhand der metabolischen Effekte, Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten unter metabolischem Stress zu ziehen.

7.1 Vergleichende Expressionsuntersuchung wichtiger am Metabolismus beteiligter Schlüsselenzyme in OC-Zellen, etablierten Tumorzelllinien und der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A

Um eine Übersicht über mögliche deregulierte Metabolismus-assozierte Schlüsselenzyme zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst Expressionsanalysen einer Vielzahl von Genen, die im Metabolismus eine Rolle spielen, durchgeführt. Hierzu wurden die analysierten Gene, wie unter 6.1. beschrieben in vier Gruppen eingeteilt.

Unter den Glykolyse-assozierten Genen (vgl. 6.1.1.) ergab sich für die OC-Zellen ein einheitliches Expressionsmuster, mit Ausnahme des MCT4 und der PDK4 (Abbildung 6.1.). Außerdem wurde eine sehr starke Expression aller Glykolyse-assoziierter Gene, besonders der LDH-Untereinheiten, detektiert. Das Expressionsmuster innerhalb der etablierten Tumorzelllinien ist deutlich heterogener. Darunter scheint vor allem die Zelllinie MCF-7 die Gene LDHB und PDK4 schwächer oder nicht zu exprimieren.

Wie bereits einleitend beschrieben (4.3.1.), ist eine Überexpression für diese Gene bereits in vielen Tumoren gezeigt worden und tritt auch in den hier untersuchten Tumorzellen auf. Überraschenderweise weist aber auch die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A, die eigentlich repräsentativ für nicht-Tumorzellen mitgeführt wurde, ebenfalls eine starke Expression der untersuchten Glykolyse-assozierten Gene auf.

Obwohl einige Gene innerhalb der untersuchten Zelllinien leicht unterschiedlich exprimiert sind, würde man dennoch anhand der Expressionsdaten einen starken glykolytischen Phänotypen mit einer gesteigerten Laktatbildung, auch in der nicht-Transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A erwarten. Einzige Ausnahme stellt dabei möglicherweise die Brustkrebszelllinie MCF-7 dar, die eine abgeschwächte Expression der LDHB aufweist.

Zusätzlich ist in MCF-7 durch die verminderte PDK4 Expression eine gesteigerte PDH-Aktivität denkbar, was ebenfalls dem glykolytischen Phänotyp entgegenwirkt. Andererseits sind die Expressionen der Gene LDHA, PDK1, PDK2 und PDK3 genauso hoch wie in den übrigen Zelllinien, was den Verlust der Gene LDHB bzw. PDK4 ausgleichen könnte. Tatsächlich wurde schon beschrieben, dass die nicht-invasiven Brustkrebszellen MCF-7 einen wesentlich geringeren aeroben Glukoseverbrauch haben (Gatenby & Gillies 2004).

Auch die Gene des Fettsäuremetabolismus wurden auf ihre Expression hin untersucht (Abbildung 6.2.), weil sowohl Fettsäuresynthese als auch deren Abbau für Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt. Die *de novo* Synthese von Fettsäuren wird zum Aufbau der Plasmamembran benötigt, während die β -Oxidation zur Energiegewinnung genutzt wird (Carracedo *et al.* 2013). Zusätzlich ist sie aber auch zur NADPH-Produktion (Pike *et al.* 2011), für die Eliminierung von potentiellen toxischen Lipiden (Samudio *et al.* 2010), die Inhibition pro-apoptotischer Signalwege (Paumen *et al.* 1997; Giordano *et al.* 2005) und für die Bereitstellung metabolischer Intermediate für das Zellwachstum (Santos & Schulze 2012) nützlich.

Die Expressionslevel der Gene, die im Lipidstoffwechsel eine Rolle spielen, sind innerhalb der Gruppe der OC-Zellen einheitlich, während die Schwankungen innerhalb der Gruppe der etablierten Zelllinien deutlicher sind. Hier fällt vor allem die Expression der Gene ACAA2 und FASN in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 auf, die deutlich gesenkt ist. Eine verminderte Expression dieser Gene ist bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Auch im Citratzyklus und der Atmungskette wäre die Deregulation einiger Enzyme vorstellbar, da ein verstärkter glykolytischer Phänotyp auch durch eine geminderte mitochondriale OXPHOS bedingt sein kann. Hierbei fällt die Expression des Enzyms ME3 auf, die in allen Tumorzellen im Vergleich zu den nicht transformierten Brustepithelzellen MCF-10A deutlich erhöht ist (Abbildung 6.3.). Eine Hochregulation dieses Genes findet unter anderem in Abwesenheit von TP53 statt. Die Regulation erfolgt über eine p53-Bindestelle, über die durch die Bindung von p53 eine Reduktion der Expression stattfindet (Jiang *et al.* 2013). Demzufolge führt der Verlust von p53 zu einer Induktion der Expression. p53-Mutationen sind häufig für Krebszellen beschrieben worden und sind auch in den hier verwendeten Tumorzellen zu finden. Während SKOV-3 Zellen eine p53-Deletion aufweisen und das Protein in HeLa-Zellen inaktiviert ist, weisen OVCAR-3, IGROV-1 und OC-Zellen eine p53 Mutation auf. Demnach ist eine gesteigerte Expression von ME3 nicht überraschend. Weiterhin besitzen MCF-7 und MCF-10A Zellen, welche eine verminderte ME3 Expression haben, Wildtyp-p53. Allerdings gibt

es unter den untersuchten Zelllinien, auch Zellen, nämlich HEY und A549, die zwar eine gesteigerte *ME3* Expression zeigen, aber trotzdem kein mutiertes p53 besitzen. Deshalb ist die gesteigerte *ME3* Expression nicht ausschließlich durch eine p53-Mutation zu erklären. Dennoch ist es nicht überraschend, dass *ME3* vermehrt in den Tumorzellen exprimiert wird. *ME3* ist die mitochondriale NADP⁺-abhängige Variante des Malat-Enzyms. Wie eingangs schon beschrieben, gehören zu den Bedürfnissen von sich teilenden Zellen die Biosynthese von Makromolekülen und die Redox-Kontrolle (Cairns *et al.* 2011). Für beide Prozesse ist NADPH, welches durch die *ME3*-Reaktion anfällt, absolut notwendig.

IDH2 liegt ebenfalls in den untersuchten Tumorzellen stärker exprimiert vor als in der zur Kontrolle mitgeführten nicht-transformierten Zelllinie MCF-10A. Auch bei der Reaktion, die durch IDH2 katalysiert wird, entsteht NADPH. Aus diesem Grund ist auch diese gesteigerte Expression hier nicht verwunderlich. Ansonsten sind aus der Literatur in diversen Tumorzellen eher Mutationen der IDH bekannt, wobei darunter ebenso hauptsächlich die NADP⁺-abhängigen Isoformen der IDH betroffen sind. Es wird vermutet, dass die Mutationen unter bestimmten metabolischen Bedingungen zu einer Aktivierung der IDH führen ("*gain of function*") (Thompson 2009). Auch hier wurde die Bedeutung der IDH für Tumorzellen bereits mit der Synthese von Makromolekülen und der Aufrechterhaltung des Redox-Status assoziiert (Thompson 2009; Vander Heiden *et al.* 2009).

Bei der Expressionsuntersuchung der Gene, die mit der Atmungskette assoziiert sind, fallen vor allem die Gene *UQCRH* und *ATP5H* auf (Abbildung 6.4.). Der Verlust der *UQCRH*-Expression in SKOV-3 und weiteren Krebszellen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Modena *et al.* 2003). Ansonsten wurde keine verminderte Expression, sondern Mutationen dieses Genes im Zusammenhang mit vielen Krebsarten, wie beispielsweise des Darms, des Ovars, der Schilddrüse oder der Brust beobachtet (Polyak *et al.* 1998; Liu *et al.* 2001; Máximo *et al.* 2002; Owens *et al.* 2011).

Die ATP-Synthase ist das finale Enzym in der oxidativen Phosphorylierung und wird auch als Komplex V bezeichnet. Auch Mutationen in diesem Enzym wurden bereits in Schilddrüsen- (Máximo *et al.* 2002), Pankreas- (Jones *et al.* 2001) und Prostatakrebs (Petros *et al.* 2005) nachgewiesen. Eine verstärkte Expression dieses Genes, wie sie in dieser Arbeit für OC_92 und OVCAR-3 Zellen vorliegt, wurde in Nierentumoren gefunden und mit einer Kompensation der ansonsten fehlerhaften Respiration begründet (Yusenko *et al.* 2010). Eine verminderte *ATP5H* Expression, wie sie für HeLa vorliegt, ist in der Literatur bisher nicht beschrieben, könnte aber auf eine Fehlfunktion der OXPHOS und damit einhergehend eine Steigerung der aeroben Glykolyse hindeuten.

Die Untersuchung der Expression diverser metabolischer Schlüsselenzyme gibt erste Hinweise auf präferenziell genutzte Stoffwechselwege. Dabei sind vor allem die Unterschiede der Tumorzellen zu den als Kontrolle mitgeführten nicht-Tumorzellen MCF-10A interessant. Eine Regulation des Metabolismus über die unterschiedlich exprimierten Enzyme ist prinzipiell denkbar, jedoch lassen die bisher erhobenen Daten keine genauen Aussagen zu, weshalb die weitere metabolische Charakterisierung der unterschiedlichen Zelllinien nötig wurde.

Außerdem wirft die starke Expression der Glykolyse-assoziierten Gene in den nicht-Tumorzellen MCF-10A die Frage auf, ob diese Zelllinie sich als Referenz eignet. MCF-10A Zellen sind die wohl am häufigsten verwendeten humanen, normalen, nicht-malignen Brustepithelzellen und weisen Merkmale eines normalen Brust-Epithels auf: Das Fehlen von Anheftung-unabhängigen Wachstum und die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Hormonen für Wachstum und Überleben. Außerdem sind sie nicht tumorigen und exprimieren nicht den Östrogen-Rezeptor (Soule *et al.* 1990). Anhand des Genexpressions-Profiles wurden die Zellen als basal-artige, nicht-transformierte, humane, epitheliale Brustdrüsenzelllinie klassifiziert (Charafe-Jauffret *et al.* 2005; Neve *et al.* 2006). Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Zellen auch Stammzellmarker in 2D Kultur exprimieren und in 3D Kultur einen einzigartigen, differenzierten Phänotyp aufweisen, der für normale Brustdrüsen-Gewebe noch nicht beobachtet werden konnte (Qu *et al.* 2015). Alles in allem haben die Zellen zwar einen basal-artigen Charakter, weisen aber trotzdem einige Merkmale mesenchymaler Krebszelllinien auf (Neve *et al.* 2006). Deshalb bleibt fraglich, ob sie ein geeignetes Modell für nicht-Tumorzellen darstellen. Diese Tatsache ist im weiteren Verlauf beim Vergleich der MCF-10A Zellen mit den Tumorzellen zu berücksichtigen. Aufgrund des Fehlens von einem geeigneten System, wie beispielsweise primäre Zellen des Ovars, die noch zur Teilung imstande sind, oder Ovarial-Zelllinien wurde dennoch auf die MCF-10A Zellen als Kontrollzellen zurückgegriffen.

7.2 Metabolische Charakterisierung von OC-Zellen, etablierten Tumorzelllinien und der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF-10A

Die Metabolische Charakterisierung, welche genauere Hinweise auf die präferentiell genutzten Stoffwechselwege liefern sollte, fand mittels unterschiedlichen experimentellen Ansätzen statt.

Zuerst wurde die Nutzung der unterschiedlichen Substrate durch die unterschiedlichen Zelllinien betrachtet und Sauerstoffverbrauch und Laktatproduktion nach Zugabe der Substrate mit Hilfe des Seahorse XFe Analyzers dokumentiert. Anschließend wurde der Einfluss von metabolischem Stress mit Hilfe von Metabolismusmodulatoren untersucht.

Substratnutzung

Die Untersuchung der Substratnutzung der OC-Zellen zeigt unter Glukosezugabe den bereits beschriebenen Warburg-Effekt, da die ECAR im Mittel signifikant auf 330 % ansteigt (Abbildung 6.6.). Der Sauerstoffverbrauch ist unter Glukosegabe deutlich geringer und beträgt nur noch knapp über 60 %. Dies ist ebenfalls ein bekanntes Phänomen und wird als der Crabtree-Effekt bezeichnet, der besagt, dass steigende Mengen an Glukose den Sauerstoffverbrauch mindern (Crabtree 1928).

Die Pyruvatzugabe bewirkt einen signifikanten Anstieg der OCR, während die ECAR nicht ansteigt. Das bedeutet, dass Pyruvat als Substrat der Energiegewinnung über OXPHOS zugeführt wird, während Pyruvat, welches über die Glykolyse aus Glukose entsteht, in der aeroben Glykolyse unter Laktatbildung metabolisiert wird. Die Begründung liegt in der Glykolyse. Während der Glykolyse wird NADH gebildet, was während der Laktatproduktion wieder zu NAD^+ reoxidiert wird. Während der Glykolyse entstehen zusätzlich auch 2 Mol ATP pro Mol Glukose. Die Umwandlung von Pyruvat, welches als Substrat aufgenommen und nicht über die Glykolyse generiert wurde, zu Laktat wäre bioenergetisch für die Zellen nicht sinnvoll. Bei der reinen Umwandlung von Pyruvat zu Laktat würde weder ATP produziert werden, noch wäre das Recycling von NADH zu NAD^+ notwendig und nützlich, da dieses zuvor auch nicht gebildet wurde. Pyruvat hat außerdem noch einen weiteren Effekt. Pyruvat wirkt inhibierend auf die PDKs, welche die PDH inaktivieren (Jeoung & Harris 2010). Der Einsatz von Pyruvat führt also zu einer stärkeren Aktivität der PDH, welche dann das Pyruvat in Acetyl-CoA und CO_2 spaltet und somit dem Citratzyklus zuführt, woraufhin die Energiegewinnung über OXPHOS erfolgen kann.

Eine Nutzung des Substrats Glutamin wurde unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen. Dies könnte zum einen auf die geringe Bedeutung dieses Stoffwechselweges in diesen Zellen zurückzuführen sein. Andererseits kann dieses Ergebnis auch den experimentellen Bedingungen geschuldet sein. In dem Experiment wurden die Zellen in reinem KHB gehalten und das jeweilige Substrat allein injiziert. Möglicherweise kommt die Glutaminverwertung erst im Zusammenhang mit weiteren extern zugeführten Substraten zum Tragen.

Die Substratverwertung unter den zur Kontrolle mitgeführten etablierten Zelllinien ist deutlich diverser (Abbildung 6.7.). Obwohl ein Anstieg der ECAR durch Glukoseinjektion in allen Zelllinien zu verzeichnen ist, was dem Warburg-Effekt entspricht, tritt der Crabtree-Effekt, also die Minderung des Sauerstoffverbrauchs nicht in allen Zelllinien in biologisch relevantem Ausmaß auf. Besonders auffallend ist dies in der Zelllinie MCF-7. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die zur Laktatbildung notwendigen Enzyme bereits das Maximum ihrer Kapazität erreicht haben. Das heißt, dass Pyruvat, welches nicht in Laktat umgewandelt

werden kann, in die Mitochondrien transportiert wird und dort nach Spaltung über Citratzyklus und Atmungskette weiter metabolisiert wird. Wie bereits anhand der Expressionsanalysen zu sehen war, liegt für MCF-7 Zellen tatsächlich eine verminderte LDHB-Expression vor, was dieses Phänomen erklären könnte. Zusätzlich wurde bereits ein geringerer aerober Glukose-Verbrauch für MCF-7 Zellen beschrieben (Gatenby & Gillies 2004). Des Weiteren liegt ebenfalls für diese Zellen eine verminderte PDK4-Expression vor, die, wie schon beschrieben, die Aktivität der PDH fördern könnte.

Einer der Gründe für die Untersuchung der etablierten Zelllinien ist die Suche nach einem geeigneten Modellsystem für die OC-Zellen. Diesbezüglich ist es schwierig eine geeignete Zelllinie zu benennen. Unter den Ovarialkarzinomzelllinien sind beispielsweise SKOV-3 und OVCAR-3 Zellen in der Lage, oxidative Glutaminolyse durchzuführen, was den OC-Zellen nicht möglich war. IGROV-1 und HEY und auch alle anderen getesteten Tumorzelllinien wiederum sind nicht in der Lage, Pyruvat der OXPHOS zuzuführen.

Mitochondriale Respiration und glykolytische Funktion

Die Substratverwertung der Zellen wurde unter einer metabolischen Zwangssituation durchgeführt, da den Zellen als exogene Energiequelle nur das jeweils zu testende Substrat zur Verfügung stand. Deshalb sollten auch die Parameter der mitochondrialen Respiration (Abbildung 6.8. und Abbildung 6.9.) und der glykolytischen Funktion (Abbildung 6.10. und Abbildung 6.11.) unter für die Zelle optimalen Voraussetzungen untersucht werden, um neben der Frage "Was können die Zellen?" auch der Frage "Was machen die Zellen unter Normalbedingungen?" nachzugehen. Diese Messungen erfolgen wie zuvor mit dem Seahorse XFe Analyzer unter Vollmedium-artigen Konditionen in *low-buffered* DMEM mit Glutamin und Glukose (ohne Serum).

Unter diesen Bedingungen zeigen die OC-Zellen, anders als anhand der Expressions- und Substratnutzungs-Analysen zu erwarten, keine einheitlichen Reaktionen. Zum einen gibt es Zellen, die sowohl eine geringe basale OCR, als auch eine geringe basale ECAR aufweisen. Hierbei fallen vor allem OC_38 und OC_122 auf. Aufgrund ihrer geringen metabolischen Aktivität würde man diese Zellen als "schwach metabolisch" bezeichnen, während beispielsweise beide OC_91-Fraktionen und auch OC_92 und OC_128 mit einer sehr hohen basalen Atmung und einer hohen basalen Azidifizierungsrate als "stark metabolisch" bezeichnet werden. Auf die enzymatische Ausstattung lassen sich diese Unterschiede nicht zurückführen. Außerdem zeigen die Reservekapazitäten, darunter vor allem die maximale Respiration, dass eine verstärkte Nutzung der Substrate unter metabolischem Druck prinzipiell möglich wäre.

Dieses Experiment illustriert deutlich die metabolische Flexibilität einiger Zellen, trotz gleicher enzymatischer Ausstattung und sehr ähnlicher Substratnutzung. Nicht alle Zellen sind an ihrem metabolischen Maximum unter Basalbedingungen angelangt. Erst durch metabolischen Druck, durch beispielsweise den Einsatz von Inhibitoren oder Entkopplern werden OCR und ECAR gesteigert. Dies gibt Aufschluss darüber, inwiefern Zellen in der Lage sind auf einen gesteigerten Energiebedarf zu reagieren.

Auch bei dieser Untersuchung wurden die etablierten Zelllinien zum Zwecke der Modellsystemfindung mitgeführt. Hierbei ist ebenfalls nicht festzulegen, welche Zelllinie sich am besten eignet. Für die mitochondriale Respiration könnten beispielsweise HeLa Zellen als Vergleich für die Zellen mit einer hohen basalen OCR dienen, während HEY Zellen sich als Modell für die OC-Zellen mit geringem basalen Sauerstoffverbrauch eignen. Andererseits haben HEY Zellen, anders als die OC-Zellen mit geringer basaler Atmung, bereits bei der basalen OCR den Maximalwert erreicht. Im Gegensatz dazu weisen HEY Zellen eine sehr hohe Glykolyse-Rate auf, was als ein Ausgleich zur vergleichsweise geringen OXPHOS interpretiert werden kann.

Ein Modellsystem ist für dieses Experiment aufgrund der Diversität der Reaktionen nicht zu benennen. Obwohl die Zellen individuelle Unterschiede aufweisen, scheinen unter diesen Bedingungen beide zur ATP-Gewinnung notwendigen Prozesse, also mitochondriale Respiration und Glykolyse vorhanden zu sein. Bezüglich der zur Kontrolle für nicht-Tumorzellen mitgeführten MCF-10A lassen sich keine Parameter festhalten, die diese Zellen deutlich von den Tumorzellen abgrenzen würden.

Einsatz von verschiedenen Inhibitoren zur Charakterisierung des Metabolismus

I. DCA

Neben der Bereitstellung nur eines externen Substrats, ist eine weitere Möglichkeit, eine metabolische Zwangssituation für die Zellen zu erzeugen, der Einsatz von Inhibitoren.

DCA gilt als vielversprechendes Medikament in der Krebstherapie, da die Behandlung einer Vielzahl von Experimentaltumoren mit DCA eine hohe Effizienz durch die Induktion von Apoptose und die Verminderung der Proliferationsrate bei geringer Toxizität für nicht-Tumorzellen aufweist (Bonnet *et al.* 2007; Cao *et al.* 2008; Wong *et al.* 2008). Außerdem ist DCA mit 150 Da ein sehr kleines Molekül, was seine Bioverfügbarkeit verbessert und dazu führt, dass es an jeden Wirkort, inklusive des Gehirns, vordringen kann (Michelakis *et al.* 2008). Da DCA bereits seit knapp 40 Jahren bei Krebspatienten zur Anwendung kommt (Michelakis *et al.* 2008), sollte es auch auf Anwendbarkeit im Ovarialkarzinom überprüft werden.

Die Wirkung von DCA beruht auf der Inhibition der PDKs, die die PDH inhibitorisch phosphorylieren. Deshalb sollte zunächst die Dephosphorylierung der PDH nach DCA-Gabe bestätigt werden. Nach Messung der unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen (Abbildung 6.13.) mit Hilfe des Bio-Plex MAGPIX Multiplex Readers konnte eine Abnahme in allen untersuchten Zelllinien gezeigt werden, wobei auffallend war, dass die PDH in MCF-7 Zellen bereits ohne DCA weitestgehend im dephosphorylierten Zustand vorliegt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte wieder die verminderte *PDK4*-Expression in diesen Zellen sein und geht einher mit dem bereits publizierten weniger glykolytischen Phänotypen dieser Zellen (Gatenby & Gillies 2004). Für die OVCAR-3 Zellen, die ebenfalls im Grundzustand ohne DCA eine schwache Phosphorylierung aufweisen, ist dies keine Erklärungsmöglichkeit, da sowohl *PDK4*, als auch die übrigen *PDKs* stark exprimiert vorliegen. Neben der Expression der *PDKs* wäre aber auch deren Proteinmenge bzw. Aktivität zu berücksichtigen, die zusätzlich verändert sein können. Außerdem wären ebenso eine verstärkte Expression oder eine gesteigerte Aktivität der PDPs, die die PDH dephosphorylieren, denkbar. Gleiches gilt für die geringe Dephosphorylierung der HEY-Zellen durch DCA-Behandlung.

Trotz des Nachweises der Dephosphorylierung zeigen die patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen überraschenderweise auf metabolischer Ebene nicht den erwarteten Effekt (Abbildung 6.15.). Zwar ist eine deutliche ECAR-Reduktion zu verzeichnen, die in etwa mit der in der Literatur beschriebenen Reduktion um bis zu 60 % übereinstimmt (Howlett *et al.* 1999; Parolin *et al.* 2000), jedoch ist der Effekt nicht stabil und gleicht sich über die Zeit dem Ausgangswert wieder an. Ebenso verhält es sich für den OCR-Anstieg.

Eine nur kurzzeitige PDK-Inhibition aufgrund einer geringen DCA-Stabilität konnte bereits experimentell durch die Messung der Phosphorylierung zu späteren Zeitpunkten nach DCA-Behandlung ausgeschlossen werden (Abbildung 6.14.), da der DCA-Effekt auch nach 24 h stabil vorhanden ist und die Phosphorylierung sogar noch weiter absenkt. Im Gegensatz zu den OC-Zellen konnten die in der Literatur beschriebenen metabolischen Effekte der DCA-Behandlung in anderen Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 6.16.). Die Zelllinien IGROV-1, A549, HeLa und MCF-10A, die eine stabile ECAR Reduktion und OCR-Steigerung über den gesamten Messzeitraum hin aufweisen, zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, die ATP-Produktion aus Glukose durch DCA weg von der aeroben Glykolyse hin zur OXPHOS zu lenken (Umkehr des Warburg-Effektes). Dies wirft die Frage auf, warum das nicht bei allen Zelllinien der Fall ist. Dieses Phänomen kann vielfältige Gründe haben. Denkbar wäre, dass die Kapazität von Citratzyklus und Atmungskette bereits erschöpft ist, weshalb eine erhöhte Pyruvat-Menge keine Steigerung der OCR zur Folge hat. Bei MCF-7 und OVCAR-3 Zellen, die bereits im Grundzustand eine starke Dephosphorylierung der PDH aufweisen, könnte das

Kapazitätsmaximum der PDH eine Erklärung für den nicht vorhandenen OCR-Anstieg sein. Auf HEY-Zellen hat DCA bezüglich der Dephosphorylierung den schwächsten Effekt, was ein Grund für das fehlende Umsteuern in Richtung OXPHOS sein könnte.

Für die OC-Zellen und die etablierte Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 ist jedoch ein kurzes Umsteuern zu verzeichnen, welches aber nicht stabil aufrecht erhalten wird. Hier wäre es möglich, dass das Kapazitätsmaximum eine Reaktion im Anschluss an die PDH betrifft. Dadurch könnte Pyruvat, welches in das Mitochondrium gelangt, durch die aktivierte PDH zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. Dabei wird NADH frei, welches dann zur ATP-Generierung mittels OXPHOS genutzt werden kann. Das würde den kurzen OCR „peak“ erklären. Die Weiterverarbeitung von Acetyl-CoA scheint aber blockiert, da der OCR-Anstieg sonst stabil bleiben würde.

Wenn das durch die PDH-Reaktion entstandene Acetyl-CoA nicht mehr weiter verarbeitet wird, akkumuliert es in der Mitochondrienmatrix. Hohe Mengen an Acetyl-CoA wirken inhibierend auf die PDH, sodass dem DCA-Effekt bezüglich der OCR entgegengewirkt wird (Hansford & Cohen 1978; Randle 1986; Jeoung & Harris 2010).

Nach der metabolischen Charakterisierung des DCA-Effektes sollte überprüft werden, ob deren Ergebnisse mit der Proliferationsinhibition korrelieren. Ein inhibitorischer Effekt auf die Proliferation bzw. eine Aktivierung der Apoptose wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Kankotia & Stacpoole 2014). Das im Zuge der aeroben Glykolyse angesäuerte Mikromilieu des Tumors führt durch eine Hochregulation der Expression proangiogenetischer und proinflammatorischer Proteine und anderer Gene, zu einem gesteigerten Potential der Invasion und Metastasenbildung. Daher wird vermutet, dass die Inhibition der Laktatbildung einer der Gründe für die antiproliferative Wirkung durch DCA-Behandlung ist (Schwickert *et al.* 1995; Xu & Fidler 2000; Fukumura *et al.* 2001; Shi *et al.* 2001; Rofstad *et al.* 2006; Doherty & Cleveland 2013). Zusätzlich wurde die Laktatakkumulation mit der Ausbreitung von Metastasen und einer schlechten Prognose assoziiert (Walenta *et al.* 1997; Chiche *et al.* 2010). Außerdem konnte experimentell der Metastasierung durch Umkehrung des sauren Mikromilieus durch Alkalisierung entgegengewirkt werden (Robey *et al.* 2009). Demzufolge sollte auch hier durch die Wirkung von DCA eine Proliferationsinhibition zu erwarten sein. Paradoxe Weise sind die Zelllinien, die metabolisch wie erwartet auf die DCA-Injektion reagieren, also A549, HeLa und MCF-10A, diejenigen die erst ab höheren Konzentrationen als 10 mM DCA eine Proliferationsinhibition zeigen, während die Zellen, die nicht den erwarteten DCA-Effekt auf metabolischer Ebene zeigen, eine deutliche Proliferationsinhibition bei 10 mM und geringeren Konzentrationen DCA aufweisen (Abbildung 6.16.). Auch unter den patientenabgeleiteten OC-Zellen reagieren die meisten bereits bei 10 mM oder weniger DCA mit einer stark erhöhten Verdopplungszeit gegenüber den Zellen ohne DCA (Tabelle 6.1.).

Die einzige Ausnahme unter den getesteten Zelllinien stellen die Ovarialkarzinomzellen IGROV-1 dar, die wie erwartet durch DCA eine stabile ECAR-Reduktion, einhergehend mit einem OCR-Anstieg, aufweisen und bereits bei geringen Konzentrationen an DCA eine deutliche Wachstumsinhibition zeigen.

Möglicherweise ist der inhibitorische Effekt auf das Zellwachstum nicht auf eine Umleitung der Energiegewinnung von der aeroben Glykolyse zu OXPHOS, und damit einhergehend einem steigenden pH zurückzuführen, sondern vielmehr auf ein mangelndes Vermögen der Zellen OXPHOS durchzuführen. Dies kann zum einen durch ein Erreichen des respiratorischen Maximums aber auch durch einen Defekt im TCA oder der Atmungskette begründet sein. Den Zellen fehlt dadurch Glukose als Energiequelle, sowohl in der aeroben Glykolyse aufgrund einer gesteigerten PDH-Aktivität und damit verbunden dem Abzug des Pyruvats von der Laktatbildung als auch in der OXPHOS.

Das mangelnde Vermögen der Zellen OXPHOS durchzuführen könnte auf eine Blockade der Reaktionsschritte im Citratzyklus zurückzuführen sein. Die Injektion von DCA hat auf metabolischer Ebene beispielsweise bei SKOV-3 und den OC-Zellen einen OCR-*"peak"* zur Folge. Dieser kann, wie bereits erläutert, beispielsweise auf eine Akkumulation von Acetyl-CoA und der damit verbundenen Inhibierung der PDH durch eine PDK-Aktivierung hindeuten (Hansford & Cohen 1978; Randle 1986; Jeoung & Harris 2010).

Außerdem wurden steigende Level an Acetyl-CoA auch mit der Inhibierung der β -Oxidation in Verbindung gebracht. Aus Acetyl-CoA kann durch die Reaktion des Enzyms Acetyl-CoA-Carboxylase Malonyl-CoA entstehen (Awan & Saggerson 1993; Saddik *et al.* 1993; Lopaschuk *et al.* 1994; Stanley *et al.* 1996). Malonyl-CoA wiederum wurde als potenter Inhibitor der CPT1 identifiziert, was eine Inhibierung der β -Oxidation nach sich zieht (Awan & Saggerson 1993; Saddik *et al.* 1993; Stanley *et al.* 1996). Des Weiteren ist Malonyl-CoA als potentieller Vermittler der Cytotoxizität, vermutlich über die Induktion der Apoptose, beschrieben (Pizer *et al.* 2000). Tatsächlich konnten nach DCA-Behandlung in Herzmuskelzellen gesteigerte Level an Acetyl-CoA und Malonyl-CoA, sowie eine Inhibition der Fettsäure-Oxidation nachgewiesen werden (Saddik *et al.* 1993; Stanley *et al.* 1996). Außerdem konnten auch in dieser Arbeit die metabolische Bedeutung der β -Oxidation bestätigt werden.

Wäre die Weiterverarbeitung von Citrat im Citratzyklus gestört, würde es zur negativen *feedback*-Hemmung der Citrat-Synthase durch akkumuliertes Citrat kommen (Beeckmans 1984), wodurch sich erneut Acetyl-CoA anstauen würde.

Für die Betrachtung des DCA-Effektes auf metabolischer Ebene eignen sich SKOV-3 Zellen als Modellsystem besonders gut, da auch diese, genau wie die OC-Zellen nur Kurzzeiteffekte mit

einer Anpassreaktion an die Ausgangswerte aufweisen. Aufgrund der sehr heterogenen Effekte auf die Proliferation nach DCA-Gabe ist hier die Betrachtung der OC-Zellen selbst angebracht.

II. Oxamat

Ebenso wie DCA sollte der Einsatz von Oxamat einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation haben und die Apoptose einleiten, da auch durch den Einsatz des LDH-Inhibitors dem weiteren Ansäuern des Mediums entgegengewirkt werden kann. Außerdem wird sowohl die Verminderung der Laktatbildung, als auch ein inhibitorischer Effekt bezüglich des Wachstums durch Oxamat beschreiben (Hamilton *et al.* 1995; Fiume *et al.* 2010).

Wie in der Literatur beschrieben, lässt sich für alle untersuchten Zelllinien durch Oxamat eine Reduktion der Laktatbildung nachweisen. Die Inhibition der Laktatproduktion durch Oxamat ohne exogene Zugabe von Glukose deutet auf die Nutzung endogener Energiequellen zur Laktatbildung hin. Tatsächlich konnte in den SKOV-3 Zellen, die unter den untersuchten Zelllinien die stärkste ECAR-Reduktion ohne exogene Energiequellen aufweisen, eine große Menge Glykogen detektiert werden (Abbildung 6.20.), welches in den letzten Jahren immer mehr Bedeutung als Energiereserve auch in Tumorzellen gewinnt (Zois *et al.* 2014).

Bei der Betrachtung des Vergleichs der ECAR-Reduktion zwischen den unterschiedlichen Medien mit exogenen Substraten ist festzustellen, dass die aerobe Glykolyse eine wichtige Rolle für alle untersuchten Zelllinien spielt, da die Reduktion der ECAR sowohl mit Glukose als alleinigem exogenen Energielieferanten, als auch im Vollmedium stattfindet (Abbildung 6.18.). Anhand der OCR, ist für die OC-Zellen hier, im Gegensatz zur DCA-Behandlung, insgesamt ein Umsteuern in die ATP-Generierung mittels OXPHOS zu verzeichnen. Der OCR-Anstieg ist in beiden getesteten Medien signifikant, wenn auch im *low-buffered* DMEM deutlich schwächer. Unter den etablierten Zelllinien sind Andere als durch die DCA-Behandlung zur Umsteuerung in die OXPHOS in der Lage (Abbildung 6.19.). Während unter DCA A549 HeLa, IGROV-1 und MCF-10A zur Steigerung der OXPHOS in der Lage waren, ist das hier HeLa und MCF-10A nicht mehr möglich. Zusätzlich weisen aber unter Oxamat HEY Zellen in KHB mit Glukose einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch auf.

IGROV-1 Zellen stellen hierbei erneut einen Sonderfall dar. Zum einen zeigt sich wieder die Bedeutung der aeroben Glykolyse in diesen Zellen, da sowohl im Medium mit Glukose als einzige exogene Energiequelle, als auch unter Vollmediumbedingungen eine sehr starke Reduktion der Laktatproduktion auftritt. Dennoch ist es diesen Zellen auch möglich, Glukose über OXPHOS zu metabolisieren.

Die Inhibition der Laktatproduktion geschieht auf zwei Wegen. Zum einen wird aufgrund der klassischen Blockade der LDH durch Oxamat Pyruvat nicht mehr zu Laktat umgewandelt. Zum

anderen dient die LDH Reaktion aber auch dem Reoxidieren von NADH zu NAD⁺. Steht nun aufgrund der Inhibition der LDH-Reaktion kein NAD⁺ für die Reaktion der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase zur Verfügung, kommt die Glykolyse zum Erliegen. Ein Anstieg der Respiration, wie er in einigen Zelllinien beobachtet werden konnte, wäre zum einen durch das Umleiten des Pyruvats in den TCA möglich. Zum anderen können aber auch Reduktionsäquivalente aus der Glykolyse zu einer gesteigerten OXPHOS beitragen. Da ein Recyceln durch die LDH-Reaktion nicht mehr möglich ist, müssen diese durch Shuttlesysteme in die Mitochondrien gelangen, um ein weiteres Ablaufen der Glykolyse zu garantieren.

Bezüglich der Proliferation (Tabelle 6.2 und Tabelle 6.3.) sind anhand der metabolischen Daten sehr schwer Rückschlüsse zu ziehen, weil die proliferationsinhibitorischen Effekte unterschiedlich stark ausfallen und auch unabhängig davon sind, ob die Zellen in der Lage sind, Glukose statt über aerobe Glykolyse über OXPHOS zu metabolisieren.

Eine mögliche Begründung der Effekte, die von den DCA-Effekten bezüglich der Proliferation abweichen, könnte in weiteren Wirkungen von Oxamat liegen. Neben LDH inhibiert Oxamat auch die Aspartat-Aminotransferase (AST) (Thornburg *et al.* 2008). Die AST ist gemeinsam mit der Malat-Dehydrogenase zuständig für die Aufrechterhaltung des Malat-Aspartat-Shuttles. Der Malat-Aspartat-Shuttle ist wiederum notwendig, um Elektronen von cytoplasmatischem NADH aus der Glykolyse auf mitochondriales NAD⁺ zu übertragen, wodurch dann NADH mitochondrial vorliegt und NAD⁺ im Cytoplasma entsteht (Greenhouse & Lehninger 1976; Lopez-Alarcon & Eboli 1986). Neben der Laktatbildung ist dies eine weitere Möglichkeit, NADH cytoplasmatisch zu NAD⁺ zu recyceln, damit zum einen die Glykolyse als wichtiger Energielieferant weiter ablaufen kann, aber auch Reduktionsäquivalente zur OXPHOS zur Verfügung stehen. Durch den Einsatz von Oxamat sind beide Wege blockiert. Damit wird der Glukosemetabolismus eingeschränkt, wenn den Zellen die Möglichkeit zur Glukose-Oxidation fehlt. Das heißt die Zellen sind, falls ihnen das möglich ist, zur OXPHOS gezwungen, wenn die Glykolyse weiter ablaufen soll.

Die Wirkung von Oxamat wurde bereits mit einer Wachstumsinhibition von HeLa-Zellen in Verbindung gebracht, allerdings in deutlich höheren Konzentrationen als die hier verwendeten (Papaconstantinou & Colowick 1961). In den hier verwendeten Konzentrationen zeigen sich HeLa Zellen in ihrer Proliferation, im Gegensatz zu den etablierten Ovarialkarzinomzelllinien, gänzlich unbeeinflusst (Tabelle 6.3.). Die Erklärungen hierfür scheinen jedoch nicht für alle Zellen gleich zu sein. So könnte bei OVCAR-3 und HEY die starke Abhängigkeit von Glukose und die hohe Umsatzrate der aeroben Glykolyse, wie sie in der Substratnutzung (Abbildung 6.7.) gezeigt wurde, für die Sensitivität bezüglich Oxamat verantwortlich sein. Bei IGROV-1 liegt die stärkste ECAR-Reduktion durch Oxamat vor, was auch für diese Zellen auf eine große

Bedeutung der aeroben Glykolyse hindeutet. Bei SKOV-3 Zellen könnte eine mögliche Erklärung das Unvermögen zur Glukose-Oxidation sein, weshalb Glukose als Energiequelle für diese Zellen entfällt.

Oxamat ist außerdem ein Inhibitor der Pyruvat-Carboxylase (Zeczycki *et al.* 2010). Bei Zellen für die diese anaplerotische Reaktion für die Funktionalität des Citratzyklus notwendig ist, würde Oxamat auch hierdurch die metabolische Aktivität und damit die Energieversorgung der Zellen beeinflussen.

III. Etomoxir

Die β -Oxidation endogener Fettreserven wurde mit Hilfe des CPT1-Inhibitors Etomoxir untersucht. Um eine Verwertung anderer Substrate auszuschließen, wurde die metabolische Untersuchung im Mangelmedium ohne exogen hinzugefügte Substrate durchgeführt (Abbildung 6.22. und Abbildung 6.23.). Dabei zeigte sich in allen Zellen deutlich die große Bedeutung der β -Oxidation endogener Fettsäure-Reserven, da eine OCR-Abnahme in allen untersuchten Zelllinien zu verzeichnen war. Dass die β -Oxidation vor allem in nicht-glykolytischen Tumoren eine große Rolle als dominanter Stoffwechselweg spielt, wurde bereits beschrieben (Liu *et al.* 2010; Caro *et al.* 2012; Li & Cheng 2014) und der Nachweis von *Lipid-Droplets* ist in den letzten Jahren in immer mehr Tumorzellen gelungen (Bozza & Viola 2010). Die hier untersuchten Zelllinien weisen aber alle eine starke Laktatbildung unter Glukose-Zugabe auf, was darauf hindeutet, dass auch glykolytische Tumore in der Lage sind, zumindest einen Teil ihrer Energie über OXPHOS zu generieren, was ebenfalls bereits gezeigt wurde (Cairns *et al.* 2011). Auch deutet die Reduktion der Respiration nach Etomoxir-Injektion auf ein Vorhandensein endogener Speicherformen von Fettsäuren hin.

Ein Problem stellt jedoch dar, dass Etomoxir in höheren Konzentrationen (ab 10 μ M) *off-target* Effekte auf die Adenin-Nukleotid-Translokase und Komplex I der Atmungskette (Divakaruni *et al.* 2016) aufweist.

Trotz der nachgewiesenen Bedeutung der β -Oxidation im Metabolismus konnten durch den Einsatz von Etomoxir keine langfristigen proliferationsinhibitorischen Erfolge erzielt werden (Abbildung 6.22. und Abbildung 6.23.), obwohl dies bereits in anderen Zellen gelungen ist. Möglicherweise ist der differenzielle Effekt dem Einsatz unterschiedlicher Medien geschuldet. Eine Untersuchung der Proliferation über mehrere Tage ist unter Mangelmedium nicht möglich. Deshalb wurde auf Vollmedium zurückgegriffen, weshalb den Zellen neben den endogenen Fettreserven auch die im Medium enthaltenen Substrate zur Verfügung stehen.

Unter diesen Bedingungen ist die β -Oxidation endogener Fettreserven möglicherweise nicht mehr nötig.

Eine der Komponenten, die im Vollmedium vorliegen ist Glutamin. In den letzten Jahren ist auch die Glutaminolyse immer weiter in den Mittelpunkt der Krebsforschung gerückt. Auch sie spielt bei proliferierenden Zellen eine große Rolle in der Generierung von Energie und in der Biosynthese von Makromolekülen. Eine Deregulation von der Glutaminolyse wurde bereits mit der Entstehung und Progression von Tumoren assoziiert und die ihre Inhibition bietet potentielle neue Therapieansätze (reviewed in Altman et al. 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Glutamin-Metabolismus weitestgehend ausgegrenzt, unter anderem auch, weil Untersuchungen zur Substratnutzung (Abbildung 6.6 und Abbildung 6.7) gezeigt haben, dass Glutamin in den untersuchten Zellen keine vorrangige Rolle spielt. Im Falle einer metabolischen Zwangssituation, wie es etwa unter Einsatz von Inhibitoren der Fall ist, könnte die Nutzung von Glutamin für die Zellen jedoch an Bedeutung gewinnen. Der Stellenwert der Glutaminolyse für Ovarialkarzinomzellen müsste in einem eigenständigen Projekt untersucht werden.

IV. SB204990

Neben der β -Oxidation sollte auch die *de novo* Synthese von Fettsäuren untersucht werden. Diese gilt als einer der wichtigsten Stoffwechselwege und wird neben seiner Bedeutung für anabole Prozesse heute mehr und mehr auch mit aggressiven Tumorverhalten, Wachstum und Überleben assoziiert (Kuhajda 2000). Tatsächlich konnte eine gesteigerte Expression und Aktivität vieler Fettsäure-Synthese-assoziiierter Enzyme in vielen Krebsarten nachgewiesen werden (Menendez & Lupu 2007; Tennant et al. 2010). Darunter gilt vor allem die ATP-Citrat-Lyase mit deren Inhibitor SB204990 als vielversprechendes therapeutisches Target, da bereits gezeigt werden konnte, dass dessen Einsatz Proliferation und Überleben von Tumorzellen *in vitro* und Tumorstadium *in vivo* limitiert (Hatzivassiliou et al. 2005).

Durch den Einsatz von SB204990 konnten bei patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen keine metabolischen Veränderungen gemessen werden (Abbildung 6.25.). Weder war der Metabolismus durch den Einsatz des ACLY-Inhibitors beeinflusst, noch konnten proliferationsinhibitorische Effekte erzielt werden. Erst ab sehr hohen Konzentrationen war in drei der acht untersuchten OC-Zellen eine langfristige Verminderung des Wachstums möglich (Tabelle 6.4.). Anders jedoch verhielten sich die etablierten Tumorzelllinien. Hier konnte in fast allen eine starke Reduktion der OCR gemessen werden (Abbildung 6.26.). Da durch die Inhibierung der Fettsäuresynthese keine direkten metabolischen Effekte zu erwarten sind, ist

die Reduktion der Respiration eher auf andere Gründe zurückzuführen. Eine Erklärung kann die Verarmung des TCA sein. Nach dem Ausschleusen des Citrats aus dem Mitochondrium wird dieses nicht weiter gespalten und kann so nicht mehr über den Citrat-Malat-Shuttle (Kornacker & Ball 1965) zurück transportiert werden, wodurch dann Oxalacetat als Akzeptor für Acetyl-CoA aus der β -Oxidation fehlt.

Weiterhin ist der Citrat-Malat-Shuttle auf den Transport von in der Glykolyse entstandenem NADH in die Mitochondrienmatrix beteiligt, was ebenfalls durch die SB204990-vermittelte Blockade der ACLY inhibiert wird. Durch die ACLY-Reaktion steht zum einen Acetyl-CoA für die Fettsäure- oder auch Cholesterinbiosynthese bereit, andererseits wird das Oxalacetat unter NADH-Verbrauch zu Malat, welches durch den Citrat-Malat-Shuttle ins Mitochondrium zurück transportiert wird (vgl. 4.4.5.).

Die Reduktion der OCR ist möglicherweise aufgrund des Fehlens von mitochondrialem NADH für die OXPHOS zu detektieren. Damit die Glykolyse wegen eines Mangels an Elektronenakzeptoren nun nicht zum Erliegen kommt, ist das Recyclen von NADH zu NAD^+ auf anderem Wege notwendig. Eine Möglichkeit wäre die verstärkte Laktatproduktion, die in der Tat bei einigen Zelllinien zu beobachten ist. Eine weitere Möglichkeit der Oxidierung von in der Glykolyse entstandenem NADH wäre dessen Transport in die Mitochondrienmatrix durch andere Shuttle-Systeme.

Auf Ebene der Proliferationsinhibition konnten zumindest zum Teil Erfolge erzielt werden, da zumindest eine kurzfristige signifikante Erhöhung der Verdopplungszeit bei SKOV-3, OVCAR-3, IGROV-1 und A549 durch SB204990 Behandlung erreicht wurde (Abbildung 6.26.). Anders als bei den zuvor getesteten Inhibitoren war in der getesteten Konzentration keine proliferationsinhibitorische Wirkung bei der als Kontrolle dienenden nicht-Tumor Zelllinie MCF-10A zu verzeichnen, was die Hauptbedingung für den Einsatz von SB204990 in der Krebstherapie darstellt. Selbst unter metabolischen Stressbedingungen, d.h. wenn den Zellen nur Glukose als exogenes Substrat zur Verfügung steht, bleibt die Proliferation der MCF-10A Zellen durch die Blockade der ACLY gegenüber unbehandelten Proben unbeeinflusst, obwohl die Reduktion der OCR nachgewiesen werden kann (Abbildung 6.27.). Vermutlich führt das Vermögen der Zellen, auch unter diesen Bedingungen dem metabolischen Stress durch eine verstärkte Laktatproduktion entgegenzuwirken, zu einer Resistenz in der Proliferationsinhibition.

V. AOA

Neben dem eben beschriebenen Citrat-Malat-Shuttle gibt es weitere Möglichkeiten glykolytisch entstandenes NADH der Energiegewinnung mittels OXPHOS zuzuführen. Diese sind der Malat-Aspartat- (Berg *et al.* 2007) und der Glycerin-Phosphat-Shuttle, wobei letzterer in den meisten Tumoren keine wichtige Rolle zu haben scheint (Boxer & Dev 1961; Letnansky & Klc 1969).

Die Vermutung von Sekundäreffekten von Oxamat auf die AST, wie sie bereits beschrieben wurden, und die Tatsache, dass für die OC-Zellen der Transport von cytosolischem NADH über Citrat-Malat-Shuttle wahrscheinlich nicht in Frage kommt, sollte die Bedeutung des Malat-Aspartat-Shuttles mit Hilfe von dessen Inhibitor Aminooxyacetat (AOA) untersucht werden. Die Rolle des Malat-Aspartat-Shuttles beim Transport cytoplasmatischer Reduktionsäquivalente in die Mitochondrienmatrix konnte bereits bestätigt werden (Eboli & Galeotti 1981). Unklar bleibt jedoch, ob der Inhibitor sich zur Tumorthherapie eignen würde, da auf diesem Gebiet bisher wenig bekannt ist.

Für die patientenabgeleiteten OC-Zellen ist, die Gesamtheit der OC-Zellen betrachtet, erneut kein metabolischer Effekt durch die Blockade eines NADH-Shuttles zu verzeichnen (Abbildung 6.29.). Dies könnte damit zu erklären sein, dass die verminderte Nutzung von Reduktionsäquivalenten für die Sauerstoff-abhängige ATP-Produktion durch andere Sauerstoff-verbrauchende Prozesse ausgeglichen wird. Hierbei wird möglicherweise auf endogene Fettreserven oder Glutamin zurückgegriffen. Außerdem könnte die Nutzung des Shuttles generell eine untergeordnete Rolle spielen, da sämtliches, im Zuge der Glykolyse entstandenes NADH durch die Laktatbildung recycelt wird.

Ähnlich sehen die Effekte für die etablierten Zelllinien aus (Abbildung 6.30.). Obwohl eine Reduktion der Respiration in einigen Zellen detektiert werden konnte, findet keine Gegenregulation über eine gesteigerte Laktatproduktion statt. Die einzige Ausnahme stellte die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 dar. Diese zeigen eine starke Reaktion auf die Injektion von AOA, sowohl was den Sauerstoffverbrauch, als auch die Laktatproduktion angeht. Anscheinend nimmt die Funktion des Malat-Aspartat-Shuttles bei SKOV-3 Zellen einen großen Stellenwert ein.

Obwohl im Großteil der untersuchten Zellen die erwarteten metabolischen Effekte ausblieben, ist die Wirkung von AOA auf die Proliferation der meisten Zellen unerwartet stark (Tabelle 6.5 und Abbildung 6.30.). In allen getesteten Zellen ist eine proliferationsinhibitorische Wirkung von AOA bereits in geringen Konzentrationen zu verzeichnen. Ausnahmen stellen OC_38, die im getesteten Bereich vollständig resistent gegen die proliferationsinhibierende Wirkung von AOA sind und OC91 <30 µm und MCF-7, die erst ab höheren Konzentrationen in ihrer

Proliferation beeinflusst sind, dar. Die Resistenz von OC_91 $<30 \mu\text{m}$ könnte damit zu erklären sein, dass sie zum einen in der sauerstoffabhängigen ATP-Generierung nicht eingeschränkt zu sein scheinen (Fett, Glutamin) und zum anderen zur Steigerung der ECAR in der Lage sind, was dem Erliegen der Glykolyse entgegenwirkt. Außerdem könnte die Nutzung des Transportweges in den nicht-AOA-sensitiven Zellen eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Die Sensitivität der übrigen Zellen könnte darauf zurückzuführen sein, dass sie zwar die Sauerstoff-gekoppelte ATP-Produktion über die Nutzung anderer sauerstoffverbrauchender Substrate ausgleichen können. Da die Laktatproduktion aber nicht gesteigert wird, ist ein negativer Effekt auf die Proliferation zu erwarten. Für jedes Pyruvat, welches in den TCA eintritt, und damit nicht zum Recyclen von NADH zu NAD^+ über die Bildung von Laktat zur Verfügung steht, müsste das im Zuge dessen glykolytisch produziertes NADH in die Mitochondrien transportiert werden. Nach AOA-Behandlung ist das über den Malat-Aspartat-Shuttle aber nicht mehr möglich, weshalb die Bildung von Pyruvat mittels Glykolyse blockiert sein könnte und die dadurch produzierten Intermediate nicht für anabole Prozesse zur Verfügung stehen. Das gleiche gilt für die Nutzung von Pyruvat für die Aminosäureproduktion. Auch hier müsste das NADH in die Mitochondrien gelangen, um ein Erliegen der Glykolyse zu vermeiden. Da die Inhibition des Malat-Aspartat-Shuttles dies verhindert, steht Pyruvat nicht mehr für die Aminosäureproduktion zur Verfügung. Aufgrund dieser Tatsachen ist eine starke Beeinträchtigung der Proliferation der Zellen plausibel.

Die Erhöhung der Verdopplungszeit bei SKOV-3 Zellen ist ebenfalls erst ab vergleichsweise hohen AOA-Konzentrationen möglich. Offenbar funktioniert die Gegenregulation so gut, dass den Zellen durch die Inhibition des Malat-Aspartat-Shuttles kein energetischer Nachteil entsteht, der sich auf die Proliferation auswirken könnte.

Neben der Blockade des Malat-Aspartat-Shuttles bewirkt die AOA-Behandlung auch die Inhibition weiterer Transaminasen, was sich auch negativ auf den Glutaminstoffwechsel auswirken kann. Zwar konnte anhand der Substratnutzungsuntersuchungen in den meisten Zellen keine bzw. nur eine schwache Glutaminolyse detektiert werden, jedoch muss die Nutzung von Glutamin nicht immer nur auf Energiegewinnung ausgelegt sein. Glutamin stellt zusätzlich einen wichtigen Stickstoffdonor dar, welches für den Aufbau von Aminosäuren, Nukleotiden und Nikotinamiden benötigt wird (Anso *et al.* 2013). Außerdem dient Glutamin als wichtige anaplerotische Reaktion für den Citratzyklus (DeBerardinis *et al.* 2007).

7.3 Synergistische Effekte der Kombination von metabolischen Inhibitoren auf Proliferation der OC-Zellen

Anhand der metabolischen Charakterisierung können einige Besonderheiten im Stoffwechsel einiger Tumorzelllinien festgehalten werden, jedoch ist eine Prognose bezüglich der Beeinflussung des Proliferationsverhaltens schwer möglich. Außerdem waren häufig hohe Konzentrationen der Einzelsubstanzen nötig, um eine signifikante und langfristige Proliferationsinhibition zu erreichen. Diese hohen Konzentrationen können unter Umständen Nebenwirkungen verursachen. Ein Beispiel stellt dabei DCA dar. Obwohl die Behandlung mit DCA eine effiziente Wirkung auf Tumorzellen hat (Bonnet *et al.* 2007; Cao *et al.* 2008; Wong *et al.* 2008), sind auch erhebliche Nebenwirkungen bekannt. In Tierexperimenten wurde gezeigt, dass DCA Leber, Nieren, Nervensystem, Hoden und Augen schädigen kann (Stacpoole *et al.* 1998). Zusätzlich wurden neurotoxische Schäden festgestellt (Stacpoole 1989).

Aufgrund derartiger Nebenwirkungen sollten nun die Konzentrationen der Einzelsubstanzen gesenkt werden und stattdessen eine Kombination der metabolischen Inhibitoren untersucht werden. Dabei wurde auf Konzentrationen der Substanzen zurückgegriffen, die alleine keinen proliferationsinhibitorischen Effekt aufweisen. Dadurch sollten mögliche Nebenwirkungen und *off-target* Effekte reduziert werden und für die Zellen eine metabolische Zwangssituation erzeugt werden, die ihre metabolische Flexibilität einschränkt. Das Ziel war hierbei Inhibitorkombinationen zu finden, die eine effiziente Erhöhung der Verdopplungszeit zur Folge haben, ohne dass die zur Kontrolle mitgeführten nicht-transformierten MCF-10A Zellen in ihrem Wachstum beeinflusst sind. Anhand des *screen*-artig angelegten Vorversuches ließen sich drei vielversprechende Kombinationen mit Oxamat ausmachen. Jeweils durch die Kombination von Oxamat mit DCA, SB204990 und AOA wurde eine langanhaltende Inhibition des Wachstums in fast allen OC-Zellen beobachtet, während die Kontrollzellen MCF-10A in ihrer Proliferation unbeeinflusst blieben bzw. nur eine kurzfristige Wachstumsverzögerung aufwiesen (Oxamat mit SB204990) (Abbildung 6.31.).

Diese Effekte auf die Wachstumsverzögerung der OC-Zellen wurden anschließend noch einmal unter Mitführung der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3, welche sich am ehesten als Modellsystem für diese Untersuchung eignet, verifiziert. Auch hier wurde die nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A zur Kontrolle mitgetestet. Wenn für eine OC-Zelllinie eine höhere Konzentration eines Inhibitors eingesetzt wurde, als sie für MCF-10A Zellen etabliert wurden, wurden diese in den MCF-10A Zellen ebenfalls getestet. Dies diente dazu sicherzustellen, dass bei einer Behandlung von Tumorzellen nicht-Tumorzellen unbeeinflusst bleiben. Anhand der Überprüfung des proliferationsinhibitorischen Effektes

konnte die stark proliferationsinhibitorische Wirkung der Kombination von Oxamat & AOA für die OC-Zellen und die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 bestätigt werden (Abbildung 6.32.).

MCF-10A Zellen bleiben unter den für sie etablierten Konzentrationen im Wachstum unbeeinflusst. Ein Problem stellen jedoch höhere Konzentrationen dar, wie sie etwa zur Proliferationsinhibition von OC_38 (1 mM) und OC_91 $<30\text{ }\mu\text{M}$ (0,6 mM) eingesetzt werden mussten. Diese führen auch in der Kontrollzelllinie zu einer starken Erhöhung der Verdopplungszeit bzw. einem Absterben der Zellen.

Die Effekte von Oxamat in Kombination mit SB204990 ließen sich für den Großteil der Zellen bei der Wiederholung bestätigen. Die Kontrollzelllinie MCF-10A zeigt sich sogar bei höheren Konzentrationen von SB204990, wie sie für die OC-Zellen zur Wachstumsinhibition nötig waren, unbeeinflusst. OC_92 und OC_119 wiesen jedoch in der Wiederholung keinerlei Beeinflussung durch diese Inhibitorkombination auf. Eine plausible Erklärung hierfür sind mögliche technische Probleme bei der Durchführung der xCELLigence RTCA. Die OC-Zellen werden normalerweise auf speziellen für die Primärkultur geeigneten Platten kultiviert. Die Proliferationsmessung findet jedoch in den diesem Analysegerät-zugehörigen Platten statt, die zudem mit Gold-Mikroelektroden beschichtet sind. Ein vermindertes Wachstum auf diesen Platten wurde vor allem für die beiden genannten OC-Zelllinien schon bei vorangegangenen Versuchen beobachtet und ist bereits an dem geringen Zellindex, der ein indirektes Maß für Proliferation darstellt, zu erkennen.

Generell scheint jedoch die Kombination von Oxamat mit einem Inhibitor eines Shuttles, welcher für den Transport von glykolytisch generiertem NADH in die Mitochondrienmatrix verantwortlich ist, ein sehr gutes Werkzeug zur Verminderung des Wachstums zu sein.

Die Zellen werden hierdurch effizient in eine metabolische Zwangssituation gebracht. Durch Oxamat ist der präferenzielle Stoffwechselweg, die Laktatbildung bzw. aerobe Glykolyse, inhibiert. Deshalb muss das aus der Glykolyse stammende NADH auf anderem Wege als der LDH-Reaktion recycelt werden, da es sonst zum Erliegen der Glykolyse käme. Potentielle Möglichkeiten hierfür sind die beiden Shuttlesysteme Citrat-Malat- oder Malat-Aspartat-Shuttle, welche durch die zusätzliche SB204990 bzw. AOA-Behandlung ebenfalls blockiert sind. Zwar haben Oxamat und AOA beide einen inhibitorischen Effekt auf den Malat-Aspartat-Shuttle, jedoch könnte aufgrund der reduzierten Konzentrationen der Inhibitoren erst durch die Inhibitorkombination die vollständige Blockade der AST erreicht werden. SB204990 hat neben einer Wirkung auf den Citrat-Malat-Shuttle außerdem noch Auswirkungen auf die Fettsäure-Synthese.

Auch der proliferationsinhibitorische Effekt der Kombination aus Oxamat und DCA kann in allen OC-Zelllinien, abgesehen von OC_38, bestätigt werden. Auch die potentielle Modellzelllinie SKOV-3 zeigt eine eingeschränkte Proliferation durch die Kombination aus Oxamat und DCA. Die als Kontrolle dienende nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF-10A, ist nur anfänglich im Wachstum inhibiert, erreicht später aber sogar einen höheren Zellindex, als die Kontrollprobe ohne Inhibitoren. Außerdem ist die für MCF-10A Zellen etablierte Konzentration an DCA ist mindestens doppelt so hoch wie für die OC-Zellen. Das bedeutet, dass man in einem potentiellen therapeutischen Ansatz eine noch geringere Konzentration wählen könnte, um eine Proliferationsinhibition für Tumorzellen zu erreichen, ohne nicht-Tumorzellen zu schädigen.

Der proliferationsinhibitorische Effekt, den die Kombination aus Oxamat und DCA verursacht ist nicht eindeutig zu erklären. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte sein, dass erst durch die Kombinationen der beiden Inhibitoren das Laktatlevel so weit reduziert werden kann, dass der proliferationsfördernden Wirkung des angesäuerten Milieus (Schwickert *et al.* 1995; Xu & Fidler 2000; Fukumura *et al.* 2001; Shi *et al.* 2001; Rofstad *et al.* 2006; Doherty & Cleveland 2013) entgegengewirkt werden kann.

Metabolisch wurde ebenfalls gezeigt, dass die DCA-Injektion sowohl in den OC-Zellen, als auch in SKOV-3 Zellen keine stabile Steigerung der OCR zur Folge hat, sondern nur einen kurzen "peak" verursacht. Die möglichen Ursachen wurden bereits bei der Diskussion der metabolischen Wirkung von DCA allein erläutert. Der "peak" deutet auf eine verminderte Weiterverarbeitung von Metaboliten im Anschluss an die PDH-Reaktion hin.

Beispielsweise könnte eine Akkumulation von Acetyl-CoA zu einer Inhibierung der PDH durch eine Aktivierung der PDKs kommen (Hansford & Cohen 1978; Randle 1986; Jeoung & Harris 2010). Die Auswirkungen von steigenden Level an Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und Citrat wurden ebenfalls bei der proliferationsinhibitorischen Wirkung von DCA allein diskutiert.

Die effiziente Proliferationsinhibition könnte auf einen additiven Effekt der Wirkungen von DCA und Oxamat zurückzuführen sein. Durch die Erzeugung der metabolischen Zwangssituation mittels Kombinationen der Inhibitoren, kommen die vielfältigen Einzelwirkungen der Einzelinhibitoren erst zum Tragen. Diese äußern sich in einer effizienten Inhibition der Proliferation, ohne dass die zur Kontrolle mitgeführten nicht transformierten MCF-10A Zellen langfristig in der Proliferation beeinträchtigt werden. Die Resistenz der MCF-10A Zellen auf diese Inhibitorkombination könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese zur ATP-Produktion aus Glukose mittels OXPHOS in der Lage sind. Deshalb treten keine inhibitorischen Effekte durch die Akkumulation von Metaboliten auf.

Unklar ist auch, welche Rolle die Makroautophagie bei der Anwendung verschiedener Metabolismusinhibitoren spielt. Makroautophagie, im Folgenden nur noch als Autophagie bezeichnet, ist ein hochkonservierter kataboler Prozess bei dem Proteine und Zellorganellen abgebaut und recycelt werden, um Nukleotide, Aminosäuren, Fettsäuren und Zucker zu gewinnen. Dies hält den Metabolismus aufrecht und führt somit zum Überleben der Zellen unter limitierter Substratzufuhr (Rabinowitz & White 2010). Autophagie erhält außerdem die Qualität der Organellen, indem beschädigte Bestandteile entfernt werden (Mizushima & Komatsu 2011). Bezüglich Krebs wird der Autophagie eine duale Rolle zugesprochen. Einerseits verhindert sie die Krebsentstehung durch ihre Qualitäts-Kontrollfunktion. Andererseits hält sie Metabolismus, Wachstum und Überleben aufrecht, indem Nährstoffe recycelt werden (White 2012). Die Inhibition der Autophagie könnte demnach ebenso ein geeignetes Werkzeug für künftige Krebstherapien sein. Viele Krebszellen regulieren Autophagie u.a. unter metabolischem Stress hoch (Zhao *et al.* 2015). Metabolischer Stress kann beispielsweise durch eine verminderte Substratzufuhr, aber auch durch eine Blockade bestimmter Stoffwechselwege entstehen. Wird also Autophagie als Gegenregulation auf die Blockade diverser Stoffwechselwege induziert, so kann die Kombination mit weiteren Inhibitoren den metabolischen Stress noch weiter erhöhen, sodass es letztendlich zum Absterben der Zellen kommt. Vielversprechende Hemmstoffe könnten hierbei, neben den Inhibitoren weiterer Stoffwechselwege auch Inhibitoren der Autophagie darstellen. Dadurch wird den Zellen die Möglichkeit der Gegenregulation genommen, wodurch zusätzliche Nährstoffquellen ausfallen. Tatsächlich wurde Oxamat bereits mit einer Induktion der Autophagie über die Inhibition des Akt-mTOR Signalweges in Verbindung gebracht (Zhao *et al.* 2015). Der Akt-mTOR Signalweg gilt als der wichtigste Negativ-Regulator der Autophagie (Manning & Cantley 2007; Nagelkerke *et al.* 2015). Die Gruppe konnte außerdem zeigen, dass eine zusätzliche Inhibition der Autophagie die Oxamat-induzierte Proliferationsinhibition und Apoptose fördert (Zhao *et al.* 2015). Auch die Wirkung von DCA wurde bereits mit einer Induktion der Autophagie über mTOR-Inhibition assoziiert (Lin *et al.* 2014).

Nachdem ein synergistischer Effekt bezüglich der Kombination verschiedener metabolischer Inhibitoren gezeigt werden konnte, wurde untersucht, ob ein synergistischer Effekt der Inhibitoren mit Chemotherapeutika vorliegt (Abbildung 6.33.). Dies geschah mit Hilfe von MTT-Assays und Konzentrationen an Chemotherapeutika, die alleine in Vorexperimenten keine signifikante Wirkung bezüglich der Proliferation aufwiesen. Ziel war es, durch das Absenken der Chemotherapeutika-Konzentration, wie auch schon im vorangegangenen Experiment, die Schädigungen der nicht-Tumorzellen und damit auch Nebenwirkungen zu minimieren.

Das Experiment bestätigt größtenteils die erwarteten Effekte bezüglich der Inhibitorkombinationen, allerdings sind keine synergistischen, sondern lediglich additive Effekte der Inhibitoren mit Chemotherapeutika zu verzeichnen. Andere Gruppen konnten jedoch synergistische Effekte von Metabolismusinhibitoren mit Chemotherapeutika nachweisen. Durch DCA-Behandlung konnte beispielsweise die Effizienz von Hypoxie-spezifischen Chemotherapeutika (Tirapazamin) gesteigert werden (Cairns *et al.* 2007). In dem experimentellen Ansatz, der dieser Arbeit zugrunde liegt, wurden jedoch Chemotherapeutika verwendet, die DNA-Quervernetzungen bilden (Carboplatin) oder als Mitose-Inhibitor (Paclitaxel) fungieren. Außerdem wurde von Cairns *et al.* (2007) ein Anstieg der Respiration durch DCA beobachtet, der weder bei den OC-Zellen noch bei den SKOV-3 Zellen stabil vorliegt.

Auch konnte durch die Behandlung mit Oxamat die Wirkung des Chemotherapeutikums Paclitaxel gesteigert und chemoresistente Brustkrebs-Zelllinien resensitiviert werden (Zhou *et al.* 2010). Die hier eingesetzten Konzentrationen sowohl von Taxol (100 nM) als auch von Oxamat (20-40 mM) liegen deutlich über den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen (2,5 nM Taxol, 5-10 mM Oxamat).

Eine synergistische Wirkung von Oxamat und Phenformin wurde ebenfalls bereits beschrieben (Miskimins *et al.* 2014). Die Wirkweise von Phenformin ist jedoch anders, als die der hier Verwendeten Inhibitoren. Miskimins *et al.* (2014) vermuten die anti-Tumorwirkung von Phenformin in der Inhibition von Komplex I der Atmungskette und der damit verbundenen gesteigerten ROS-Produktion. Die Kombination mit Oxamate vermindert zusätzlich die ATP-Produktion über Laktat-Produktion.

In diesem Experiment ist auffällig, dass auch durch die Einzelsubstanzen, vor allem bei der Gabe von DCA und Oxamat in fast allen getesteten Tumorzelllinien eine verminderte Zellzahl zu verzeichnen ist. Dies kann mit den unterschiedlichen Abläufen und dem *read-out* der beiden Assays begründet werden. Während der MTT-Assay lediglich eine Endpunkt-Messung darstellt, wird bei der Proliferationsmessung die Impedanzänderung über einen langen Zeitraum dokumentiert. Der Proliferations-Assay beruht auf der Messung der Veränderung des Wechselstromwiderstandes, der abhängig von der Anzahl und dem Anheftungszustand der Zellen ist. Der *read-out* im MTT-Assay beruht auf der Umsetzung des Farbstoffes, einem gelben Tetrazoliumsalz, in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Die Umsetzung erfolgt durch Dehydrogenasen abhängig von den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH (Berridge *et al.* 1996). Die Manipulation der Zellen durch Stoffwechsellinhibitoren kann aber

ebenfalls Auswirkungen auf die Level von NADH und NADPH haben, weshalb nur Effekte, die sich in beiden Messverfahren bestätigen ließen als verlässlich einzustufen sind.

Obwohl die patientenabgeleiteten Ovarialkarzinomzellen im Zuge dieser Arbeit als biologische Replikate betrachtet wurden, sind doch individuelle Unterschiede auszumachen. Eine einheitliche Reaktion der unterschiedlichen Tumorzellen wäre aber auch sehr unwahrscheinlich, da deren Ursprung und Entstehung individuell sind. Deshalb ist es ratsam jeden Tumor individuell zu betrachten, eine personalisierte Tumordiagnostik durchzuführen, um dann patientenspezifisch optimierte Therapiekonzepte anzuwenden.

Im Allgemeinen ist jedoch zu sagen, dass es nicht möglich ist, anhand der metabolischen Effekte von Modulatoren eine Prognose auf deren Effekte auf die Proliferation zu treffen. Auch anhand der metabolischen Charakteristika "mitochondriale Respiration" und "glykolytische Funktion" kann der Effekt der Erzeugung eines metabolischen Drucks auf die Proliferation nicht vorhergesagt werden.

Hier müsste die Stichprobenzahl erhöht werden, um eine Gruppenbildung möglich zu machen. Bezüglich der Proliferation ist die Anwendung von Metabolismus-Inhibitoren als Einzelsubstanzen wenig erfolgsversprechend. Deren Kombination, vor allem mit den LDH-Inhibitor Oxamat, hat bereits in geringen Konzentrationen eine effiziente Verlangsamung der Zellteilungsrate zur Folge. Generell könnte die pharmakologische Manipulation des Metabolismus von Tumorzellen eine gute Möglichkeit sein die anti-Tumorthherapie zu verbessern. Hierfür müssten jedoch weiterführende Versuche stattfinden, die den Einsatz weiterer Chemotherapeutika und anderer Konzentrationen in Kombination mit Metabolismus-Inhibitoren untersuchen.

7.4 Besonderheiten im Metabolismus der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3

Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe von Dr. Evelyn Schnitzer haben gezeigt, dass sowohl in SKOV-3 Zellen als auch in OC-Zellen *PDK4* als wichtiges Schlüsselenzym durch Adhärenzverlust hochreguliert ist. Außerdem geht der Adhärenzverlust mit einem gesteigerten glykolytischen Phänotyp einher. Aus diesem Grund wurde der Metabolismus der SKOV-3 Zellen näher betrachtet. Weitere im Rahmen dieser Arbeit festgestellte Ähnlichkeiten machten SKOV-3 Zellen zu einem geeigneten Modellsystem zur Untersuchung primärer Zellen.

Es konnte bewiesen werden, dass die von Dr. Schnitzer gezeigte *PDK4*-Induktion durch Adhärenzverlust zu einem Anstieg der PDH-Phosphorylierung führt (Abbildung 6.34.)

In der Literatur ist eine gesteigerte *PDK4*-Expression aufgrund von Adhärenzverlust bekannt und geht außerdem mit einer gesteigerten Aktivität der PDH einher (Grassian *et al.* 2011). Hier wird zur Untersuchung allerdings die Zelllinie MCF-10A herangezogen, bei der eine DCA-

Behandlung erwartungsgemäß eine Steigerung der Respiration und ein Absenken der Laktatproduktion zur Folge hat.

Bei der Betrachtung des Verlaufs der OCR und ECAR nach DCA-Zugabe in SKOV-3 und A549 Zellen (Abbildung 6.35.) tritt auch für A549 Zellen der erwartete Effekt auf, SKOV-3 Zellen weisen jedoch nur einen kurzen Anstieg in der OCR und einen Abfall in der ECAR auf, der sich über die Dauer der Messung wieder den Ausgangswerten angleicht. Nun stellt sich die Frage warum trotz einer nachweislich gesteigerten PDH Aktivität die Zellen nicht zu einer dauerhaft gesteigerten OXPHOS imstande sind.

Dieses Phänomen ist auch anhand des LDH-Inhibitors Oxamat zu erkennen (Abbildung 6.36.). Hier zeigen SKOV-3 zwar erwartungsgemäß einen signifikanten ECAR-Abfall, jedoch wird das nun akkumulierende Pyruvat nicht unter Sauerstoffverbrauch metabolisiert, was aber bei den zur Kontrolle mitgeführten A549 Zellen der Fall ist.

Eine Erklärungsmöglichkeit der DCA- und Oxamat-Effekte in den SKOV-3 Zellen ist ein Defekt im Citratzyklus. Würde der Defekt des Citratzyklus nach der PDH-Reaktion vorliegen, könnte damit der kurze OCR-*"peak"* nach DCA- und Oxamat-Zugabe erklärt werden. Pyruvat, welches sich im Mitochondrium befindet, würde dann durch die PDH zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. Dabei wird NADH frei, was zur ATP-Generierung mittels OXPHOS genutzt werden kann. Durch eine fehlende Weiterverwertung des Acetyl-CoAs bleibt jedoch der Effekt nicht stabil, weil die Gleichgewichtsreaktion durch Akkumulation des Produktes nach einiger Zeit zum Erliegen kommt.

Außerdem wird sowohl durch Oxamat, welches die LDH direkt inhibiert, als auch durch DCA, welches das aus der Glykolyse entstandene Pyruvat von der Laktat-Produktion abzieht, das Recyclen von NADH zu NAD^+ verhindert. Da kein NAD^+ mehr als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht, wird die Glykolyse gehemmt. Die Reduktion des Laktat-Levels durch DCA, ohne dass eine direkte Blockade der LDH vorliegt, konnte bereits beobachtet werden (Shangraw & Jahoor 2004; Hoshino *et al.* 2015).

Eine andere Möglichkeit NADH zu NAD^+ zu recyceln bzw. NADH aus der Glykolyse in die Mitochondrien zu transportieren, wodurch cytoplasmatisch NAD^+ entsteht, ist die Verwendung von Shuttlesystemen (siehe 4.4.5.). Auch auf diese Weise kann glykolytisch entstandenes NADH der ATP-Produktion über OXPHOS zugeführt werden. Allerdings deutet der rapide und sehr starke ECAR-Abfall darauf hin, dass die Kapazitäten der Shuttlesysteme sehr schnell erreicht sind.

Der kurzzeitige ECAR-Abfall könnte aber auch durch eine DCA-vermittelte PDH-Aktivierung begründet sein, die zumindest kurzzeitig eine gesteigerte Pyruvat-Umsetzung zur Folge hat. Das Pyruvat steht damit dann nicht mehr für die Laktatbildung zur Verfügung. Auch der ECAR-

Abfall bleibt nicht stabil vorhanden da die Gleichgewichtsreaktion der PDH durch Akkumulation von Acetyl-CoA zum Erliegen kommt und dann wieder Pyruvat zur Laktatbildung zur Verfügung steht.

Die Überlegung, ob die Zellen überhaupt in der Lage sind, OXPHOS durchzuführen, oder ob ein Defekt der Atmungskette in SKOV-3 Zellen vorliegt, konnte anhand der indirekten Blockade der β -Oxidation mittels Etomoxir widerlegt werden. Hier ist eine konzentrationsabhängige Reduktion der OCR durch Etomoxir und der dazugehörigen ATP-gekoppelten Respiration zu verzeichnen (Abbildung 6.37.).

Geht man von einem Defekt des Citratzyklus in den SKOV-3 Zellen aus, so sollte dies jedoch auch negative Auswirkungen auf die β -Oxidation haben, es sei denn, die Zellen beschreiten einen alternativen Stoffwechselweg.

Im Prinzip sind alle Zellen aufgrund ihrer Stoffwechselkompetenz und enzymatischen Ausstattung in der Lage, Fett auf- und abzubauen. Denkbar wäre ein bisher nicht in der Literatur beschriebener, zyklischer Ablauf von Fettauf- und -abbau, der im Rahmen dieser Arbeit als FAC (*Fatty Acid Cycle*) bezeichnet wird (Abbildung 6.38.).

In diesem Zyklus würden Fettsäuren in die Mitochondrienmatrix gelangen, wo Acyl-CoA im Zuge der β -Oxidation weiter verarbeitet wird. Acyl-CoA wird unter Entstehung der Reduktionsäquivalenten FADH_2 und NADH zu Acetyl-CoA metabolisiert. Diese Reduktionsäquivalenten können zur ATP-Produktion während der OXPHOS genutzt werden. Durch die Citrat-Synthase wird das Acetyl-CoA zusammen mit Oxalacetat zu Citrat kondensiert. Durch den Citrat-Malat-Shuttle (Kornacker & Ball 1965) kann dieses ins Cytoplasma gelangen und dort durch die ACLY wieder zu Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten werden. Das Acetyl-CoA steht nun wieder zur Fettsäure-Synthese zur Verfügung. Dieser Prozess benötigt NADPH , welches aus der Glucose im Pentosephosphatweg generiert wird.

Das aus dem Citrat entstehende Oxalacetat kann im Cytoplasma durch das Enzym Malat-Dehydrogenase unter Verbrauch von NADH zu Malat reduziert werden. Malat wird wiederum durch einen Antiporter im Austausch gegen Citrat wieder ins Mitochondrium transportiert. Auf diesem Weg gelangt auch im Cytoplasma entstehendes NADH in die Mitochondrien, wo es zusammen mit den Reduktionäquivalenten aus der β -Oxidation in der Atmungskette zur Energiegewinnung über OXPHOS genutzt werden kann. Das nun im Mitochondrium befindliche Malat wird durch die Malat-Dehydrogenase wieder zu Oxalacetat oxidiert, welches wiederum als Akzeptor für Acetyl-CoA aus der β -Oxidation zur Verfügung steht.

Dieser Stoffwechselweg würde viele Vorteile für die Zellen bringen. Die nicht genutzten Fettsäuren könnten als *Lipid-Droplets* gespeichert werden. Große Mengen an *Lipid-Droplets*

wurden bereits in vielen Tumoren gefunden (Accioly *et al.* 2008; Yue *et al.* 2014; Guillaumond *et al.* 2015; Qiu *et al.* 2016) und werden als Kennzeichen für die Aggressivität der Tumore angesehen (Bozza & Viola 2010; Yue *et al.* 2014; Abramczyk *et al.* 2015; de Gonzalo-Calvo *et al.* 2015).

Dieses Depot macht die Zellen unabhängiger von der Substratzufuhr, die in Tumoren häufig sehr minimiert sein kann (Schlappack *et al.* 1991; Jang & Hill 1997; Rofstad *et al.* 2006).

Die Verwertung der Glukose über den Pentosephosphatweg bringt zusätzliche Vorteile. Hierbei wird NADPH produziert, was zum einen ein wichtiges Reduktionsäquivalent für anabole Prozesse ist, zum anderen wird es benötigt, um ROS mittels Glutathion unschädlich zu machen. Alternativ kann im Pentosephosphatweg aber auch Ribose gebildet werden, welche für die Nukleinsynthese nötig und Voraussetzung für proliferierende Zellen ist.

Die experimentelle Problematik besteht im Nachweis des zyklischen Ablaufs. Aufgrund des Fettdepots hat die Hemmung der FASN keine kurzfristige Auswirkung auf OCR und ECAR. Eine 24 stündige Inkubation mit dem FASN-Inhibitor Orlistat führt allerdings zu einer deutlichen Absenkung der OCR (Abbildung 6.40.). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Fettsäure-Synthese nicht nur für anabole Prozesse, sondern auch für Aufrechterhaltung der Energiegewinnung notwendig ist. Eine Rest-OCR ist jedoch immer noch vorhanden. Grund dafür könnte sein, dass die Orlistat-Behandlung nicht lang genug war, um das vorhandene Fettdepot abzubauen. Eine längere Inkubation mit Orlistat führt allerdings zum Tod der Zellen, weshalb keine Messung mehr möglich ist. Diese beiden Befunde zeigen die Bedeutung der *de novo* Fettsäuresynthese in SKOV-3 Zellen.

Durch die Blockade der FASN konnten keine kurzfristigen metabolischen Effekte erzielt werden. Findet die Blockade jedoch einen Schritt vorher, bei der ATP-Citrat-Lyase statt, können starke Effekte auf OCR und ECAR in SKOV-3 Zellen detektiert werden, die sich zu den Kontrollzellen A549 deutlich unterscheiden (Abbildung 6.41.).

Eine Reaktion auf eine Blockade der Fettsäure-Synthese wäre aufgrund eines Fettdepots in den Zellen erst nach einiger Zeit zu erwarten. Die metabolische Reaktion der SKOV-3 Zellen auf die Blockade der ACLY kann verschiedene Gründe haben. Wird das Citrat nicht mehr gespalten, kann dies zu einem Rückstau führen und dadurch negative Auswirkungen auf die Glykolyse haben. Gelangt kein Malat zurück ins Mitochondrium, so steht auch kein Oxalacetat als Akzeptor für aus der β -Oxidation anfallendes Acetyl-CoA zur Verfügung, was diese wiederum abbremsen würde. Weitere Konsequenzen eines Citrat-Rückstaus wurden in Abschnitt 7.3. diskutiert.

In diesem experimentellen Ansatz ist nur Glukose als exogene Substratquelle vorhanden. Wäre beispielsweise Glutamin im Medium vorhanden, würde dies möglicherweise den Effekt von SB204990 abschwächen, da dann Glutamin den Akzeptor für das Acetyl-CoA aus der β -Oxidation liefern könnte.

Eine weitere Erklärung für die Effekte der ACLY-Inhibition ist, dass in der Glykolyse anfallendes NADH nach Inhibition des Citrat-Malat-Shuttles auf diesem Weg nicht mehr in die Mitochondrien gelangen kann, wo es üblicherweise über die OXPHOS zur Energiegewinnung genutzt wird.

Bei den Kontrollzellen A549 bewirkt die ACLY-Inhibition lediglich einen kurzen OCR-Anstieg, während die ECAR unverändert bleibt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass durch die Blockade der ACLY das Citrat nicht mehr der Fettsäuresynthese zur Verfügung steht und stattdessen über den Citratzyklus, der in diesen Zellen funktionsfähig ist, metabolisiert wird.

Nachdem die Inhibition des Citrat-Malat-Shuttles eine metabolische Sonderstellung der SKOV-3 Zellen im Vergleich zu A549 Zellen aufgezeigt hat und dies möglicherweise auf den Verlust des NADH Transports aus der Glykolyse in die Mitochondrien zurückzuführen ist, sollte ein weiteres Shuttlesystem untersucht werden. Der Malat-Aspartat-Shuttle (Berg *et al.* 2007) stellt eine weitere Möglichkeit dar, NADH in die Mitochondrien zu transportieren. Zur Untersuchung der Bedeutung des Malat-Aspartat-Shuttles wurde AOA, der Inhibitor der Aspartat-Transaminase, verwendet.

Hierbei zeigt sich eine Abnahme der OCR in beiden Zelllinien, wobei diese in den SKOV-3 Zellen wesentlich stärker ist und fast deren gesamte ATP-Produktion über OXPHOS inhibiert. In A549 Zellen ist die ATP-Produktion nach AOA Behandlung jedoch noch deutlich vorhanden, was die nachfolgende Oligomycin-Injektion zeigt (Abbildung 6.42.).

Auch der Effekt auf die ECAR unterscheidet sich deutlich zwischen den beiden Zelllinien. Während bei SKOV-3 Zellen nach AOA-Injektion ein deutlicher ECAR-Anstieg zu verzeichnen ist, zeigt sich in A549 kaum eine Reaktion. Die anschließende Oligomycin-Injektion zeigt die maximale glykolytische Kapazität der Zellen. Diese ist in den A549 Zellen trotz AOA-Behandlung noch deutlich vorhanden, während die ECAR in den SKOV-3 Zellen nach AOA-Injektion durch Oligomycin nicht mehr steigerbar ist.

Dieser Versuch zeigt die Bedeutung des Malat-Aspartat-Shuttles in den SKOV-3 Zellen im Vergleich zu A549 Zellen. Die Blockade dieses Shuttles führt dazu, dass in SKOV-3 Zellen unter den experimentellen Bedingungen fast keine ATP-Generierung unter Sauerstoffverbrauch stattfindet. Stattdessen nutzen die Zellen ihre gesamte glykolytische Kapazität zur Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes.

Alle bisher gezeigten Daten deuten auf einen Defekt des Citratzyklus und das Ablaufen eines alternativen Weges hin. Die Frage, wo der potentielle Defekt im Citratzyklus liegt, sollte mit Hilfe von ^{13}C -Stoffflussanalysen beantwortet werden. Hierbei wurden die Zellen in Medium mit unmarkierten Substraten, $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ Glukose oder $\text{U-}^{13}\text{C}$ Glutamin kultiviert und die Massenverteilung verschiedener Metabolite mittels GC/MS gemessen (Abbildung 6.44.).

Die ^{13}C -Stoffflussanalyse zeigt anhand der Bildung von M5 Glutamat, M5 α -Ketoglutarat, M4 Malat und M4 Citrat aus $\text{U-}^{13}\text{C}$ Glutamin, die in allen Zellen vergleichbar ist, dass der Citratzyklus zwischen α -Ketoglutarat und Citrat auch in SKOV-3 Zellen funktioniert. Der Stofffluss von $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ Glukose ist wesentlich schwieriger zu bewerten. Während die Bildung von M2 und M3 Pyruvat und Laktat und auch von markiertem Citrat noch gut nachgewiesen werden kann, fällt dies für den Rest der Citratzyklusmetabolite deutlich schwerer. Deshalb kann diesbezüglich keine eindeutige Aussage getroffen werden. Dies liegt unter anderem auch da dran, dass aus $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ Glukose ein M2 und ein unmarkiertes Pyruvat entsteht, sodass nur jedes zweite Citrat durch einen Einbau eines Acetyl-CoAs aus der Glykolyse markiert wird. Möglicherweise wäre es hier notwendig das Experiment mit vollmarkierter Glukose zu wiederholen, sodass die Markierung deutlicher wird. Dieses Experiment basierte jedoch auf der Publikation von Grassian et al. (2011), die mittels $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ Glukose die Bildung von markierten Citratzyklusmetaboliten deutlich nachweisen konnten.

Die ^{13}C -Stoffflussanalyse mit $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ Glukose zeigt eine leichte Zunahme an ^{13}C -markiertem Serin in den Zelllinien SKOV-3 und A549, wohingegen dies in MCF-10A Zellen nicht der Fall zu sein scheint.

Es ist bereits bekannt, dass Serin in Tumorzellen eine große Rolle spielt. Serin kann zu Glycin umgewandelt werden, was wiederum als Kohlenstoffquelle für den C1-Stoffwechsel dient. Der C1-Stoffwechsel umfasst biochemische Reaktionen, bei denen Verbindungen mit einem Kohlenstoffatom übertragen werden und wird zur Synthese von Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren und anderen Kofaktoren benötigt (Amelio et al. 2014). In Krebszellen werden laut Literatur ca. 10 % des aus der Glykolyse stammenden 3-Phosphoglycerats in das Serin-Vorläufer-Molekül 3-Phosphohydroxy-Pyruvat umgewandelt. Dies ist möglicherweise auf die gesteigerte Expression einiger Gene im Serin-Biosynthese-Signalweg zurückzuführen, was beispielsweise bei einigen Brusttumoren der Fall ist und mit Metastasierung und einer schlechten klinischen Prognose assoziiert ist (Pollari et al. 2011). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung der Expression von *PHDGH* (Phosphoglycerat-Dehydrogenase) in der Brustepithelzelllinie MCF-10A, welche unter normalen Bedingungen keinen gesteigerten Serin-Stoffwechselaufweist, zu einer malignen Transformation führt (Locasale et al. 2011, 2012).

Nach den ^{13}C -Stoffflussanalysen lag die Vermutung nahe, dass der Defekt im Citratzyklus zwischen Citrat und α -Ketoglutarat liegen könnte. Da die Expressionsanalysen dieser Enzyme keine Unterschiede aufwiesen, sollten Messungen der Enzymaktivität von IDH und ACO von SKOV-3 Zellen im Vergleich zu den anderen etablierten Zelllinien Aufschluss geben (Abbildung 6.45.). Die Aktivitäten der Enzyme IDH (sowohl NAD^+ - als auch NADP^+ -abhängig) und ACO schwanken innerhalb der untersuchten Zelllinien zwar leicht. Es gibt jedoch keine Hinweise auf einen Defekt dieser Enzyme, vor allem weil die Aktivität von IDH (NADP) und ACO in den A549 Zellen, welche immer als Positivkontrolle für einen funktionierenden Citratzyklus mitgeführt wurden, im Vergleich zu SKOV-3 Zellen sogar geringer ist. Die Messung der LDH, welche sich im Cytoplasma befindet dient zur Qualitätskontrolle der Fraktionierung. Bei SKOV-3 Zellen enthält die Membranfraktion mit Abstand die größte LDH-Menge. Da sich IDH und ACO sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma befinden, ist aufgrund der Cytoplasma-Verunreinigung der SKOV-3 Probe die Aktivität beider Enzyme möglicherweise niedriger als gemessen einzuschätzen.

Anhand der Enzymaktivitäten von ACO und IDH kann ein TCA-Defekt nicht bewiesen werden. Auch die ^{13}C -Stoffflussanalyse deutet nicht unbedingt auf einen Defekt im Citratzyklus hin.

Wenn der spezielle Stoffwechsel der SKOV-3 Zellen nicht anhand eines Defekts im Citratzyklus zu erklären ist, stellt sich die Frage, was stattdessen die metabolische Besonderheit dieser Zellen ausmacht. Da Glukose als Substrat von den Zellen präferenziell in der aeroben Glykolyse zu Laktat metabolisiert wird, wurde den Zellen Pyruvat als Substrat gegeben. Eine Umwandlung von exogen zugeführtem Pyruvat in Laktat wäre für die Zellen energetisch nicht sinnvoll. Auf diese Weise wurde untersucht, ob Pyruvat zur ATP-Gewinnung unter Sauerstoffverbrauch genutzt werden kann.

Die Injektion von Pyruvat zeigte sowohl unter DCA-Vorbehandlung als auch in der Kontrolle ohne DCA einen stabilen OCR-Anstieg (Abbildung 6.46.).

Das bedeutet, dass Pyruvat nach DCA-Gabe über OXPHOS metabolisiert werden kann. Die DCA-Injektion ohne dass exogenes Pyruvat gegeben wird führt jedoch nur zu einem OCR-„peak“.

Sowohl Pyruvat als auch DCA wirken inhibierend auf die PDKs, woraufhin eine inhibierende Phosphorylierung der PDH ausbleibt und die PDH-Aktivität gesteigert ist. Jedoch bleibt fraglich, warum sich der OCR-Verlauf unter den beiden Bedingungen unterscheidet.

RNA-Sequenzierungs-Daten dieser Arbeitsgruppe (Abbildung 6.48.) weisen darauf hin, dass die Expression des Gens MPC1 in SKOV-3 Zellen im Vergleich zu unterschiedlichen primären Zellen deutlich unterrepräsentiert ist. MPC1 ist ein Teil des MPC1/MPC2-Heterodimers, welches für

den Transport von Pyruvat in das Mitochondrium verantwortlich ist. Das Fehlen von einer der beiden Untereinheiten führt zum Verlust von mitochondrialer Pyruvat-Aufnahme (Bricker *et al.* 2012; Herzig *et al.* 2012). Außerdem wurde bereits gezeigt, dass das Proteinlevel in SKOV-3 Zellen von sowohl MPC1 als auch MPC2 im Vergleich zu anderen Krebszelllinien deutlich schwächer ist (Schell *et al.* 2014). Es bleibt die Frage, wieso die Pyruvat-Zugabe dennoch zu einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch führt. Bereits 1974 wurde beschrieben, dass Pyruvat in hohen Konzentrationen ohne einen speziellen Transporter Membranen durchqueren kann, wobei Konzentrationen von 2 mM, wie sie in diesem Experiment verwendet wurden, als hoch angesehen wurden (Bakker & Van Dam 1974; Halestrap & Denton 1975; Halestrap & P 1975). Es ist also anzunehmen, dass in den SKOV-3 Zellen der Pyruvat-Transporter in verminderter Anzahl vorliegt, wodurch die Nutzung von Pyruvat über OXPHOS begrenzt möglich ist. Dies erklärt auch die metabolischen Effekte von DCA und Oxamat. Die OXPHOS selbst ist nicht beeinträchtigt, was anhand der Bedeutung der β -Oxidation gezeigt werden konnte. Obwohl kein Defekt im Citratzyklus vorzuliegen scheint ist die Energiegewinnung über den in dieser Arbeit postulierten FAC nicht unwahrscheinlich. Zum einen sind sowohl Fettauf- als auch -abbau von großer Bedeutung für die Zellen. Zum anderen bietet die Nutzung des FACs viele Vorteile für die Zellen, wobei die Unabhängigkeit von externer Substratzufuhr und eine hohe anabole Kapazität durch Verlagerung des Glukosestoffwechsels in Richtung Pentosephosphatweg, als die wichtigsten Vorteile zu nennen sind.

7.5 Schlussfolgerungen und Perspektiven

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine große Diversität im Intermediärstoffwechsel der untersuchten Zelllinien festgestellt werden. Dabei unterscheiden sich sowohl die etablierten Ovarialkarzinomzelllinien von den OC-Zellen, als auch die OC-Zellen untereinander hinsichtlich der Nutzung der unterschiedlichen Stoffwechselwege. Außerdem zeigte sich, dass die Anwendung einzelner Inhibitoren nur in exzessiv hohen Konzentrationen die Proliferation hemmten, was aus translationaler Sicht nicht zielführend ist. Im Gegensatz dazu führte die Kombination verschiedener Inhibitoren zu einer effizienten Proliferationsinhibition.

Auch die Korrelation der metabolischen Reaktionen mit Effekten auf die Proliferation fiel sehr heterogen innerhalb der getesteten Zellen aus. Generell zeigte sich sowohl metabolisch als auch bezüglich der Proliferation eine hohe Plastizität der Zellen. Effekte kamen häufig erst unter erhöhtem metabolischen Druck zustande, z. B. bei gleichzeitiger Limitierung von Substratquellen, und häufig führte die Inhibition eines Stoffwechselweges zur Umschaltung auf einen anderen Weg. Ein Beispiel für die hohe Plastizität der Zellen ist auch der im Rahmen dieser Arbeit postulierte FAC, der für Tumorzellen Vorteile hinsichtlich einer Unabhängigkeit

von externer Substratzufuhr bei einer gleichzeitig gesteigerten anabolen Kapazität aufgrund der Verlagerung des Glukosestoffwechsels in Richtung Pentosephosphatweg haben könnte.

Durch den Versuch die metabolische Plastizität durch die Kombinationen von Inhibitoren einzuschränken konnten erste Erkenntnisse bezüglich ihres translationalen Potentials gewonnen werden. Hierbei zeigte sich, dass die Kombination verschiedener Stoffwechselmodulatoren in Konzentrationen, in denen sie als einzelner Wirkstoff wirkungslos waren, zu deutlichen synergistischen Effekten führte. Vor allem die Kombination von Oxamat mit den Inhibitoren DCA, AOA sowie SB204990 verursachte eine deutliche Proliferationsinhibition, bis hin zum Absterben der Zellen. Die Blockade verschiedener Stoffwechselwege bietet demnach eine potentielle Angriffsstelle für künftige Krebstherapien. Zudem könnte die Untersuchung dieser Hemmstoffe in Kombination mit Chemotherapeutika oder Modulatoren von Signalwegen ggf. zu optimierten Therapiekonzepten führen.

Im Hinblick auf mögliche therapeutische Applikationen muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden, auf welche Weise die Proliferationsinhibition erfolgt. Denkbar wären zum einen Effekte auf den Zellzyklus, die transient sind. Andererseits können die Inhibitoren auch die Apoptose einleiten und damit zum Zelltod führen. Die Rolle der Autophagie im Zusammenhang mit der Kombination der Metabolismusinhibitoren ist bisher noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

8 Literaturverzeichnis

- Abramczyk H, Surmacki J, Kopeć M, Olejnik AK, Lubecka-Pietruszewska K & Fabianowska-Majewska K 2015 The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. *The Analyst* **140** 2224–2235. (doi:10.1039/C4AN01875C)
- Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS, Kaufmann C, Morgado-Diaz JA, Bozza PT & Viola JPB 2008 Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Research* **68** 1732–1740. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1999)
- Ahn WS & Antoniewicz MR 2011 Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic Engineering* **13** 598–609. (doi:10.1016/j.ymben.2011.07.002)
- Alison MR 2001 Cancer. *Life Sciences* 1–8. (doi:10.7202/1009082ar)
- Alo' PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C & Di Tondo U 1996 Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* **77** 474–482. (doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19960201)77:3<474::AID-CNCR8>3.0.CO;2-K)
- Altman BJ, Stine ZE & Dang C V 2016 From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **16** 619–634. (doi:10.1038/nrc.2016.71)
- Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, Agostini M & Melino G 2014 Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends in Biochemical Sciences* **39** 191–198. (doi:10.1016/j.tibs.2014.02.004)
- Anso E, Mullen AR, Felsher DW, Matés JM, Deberardinis RJ & Chandel NS 2013 Metabolic changes in cancer cells upon suppression of MYC. *Cancer & Metabolism* **1** 7. (doi:10.1186/2049-3002-1-7)
- Astuti D, Latif F, Dallol a, Dahia PL, Douglas F, George E, Sköldbberg F, Husebye ES, Eng C & Maher ER 2001 Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *American Journal of Human Genetics* **69** 49–54. (doi:10.1086/321282)
- Awan MM & Saggerson ED 1993 Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *The Biochemical Journal* **295** (Pt 1) 61–66.
- Bakker EP & Van Dam K 1974 The movement of monocarboxylic acids across phospholipid membranes: evidence for an exchange diffusion between pyruvate and other monocarboxylate ions. *BBA - Biomembranes* **339** 285–289. (doi:10.1016/0005-2736(74)90325-3)
- Bandyopadhyay S, Pai SK, Watabe M, Gross SC, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Saito K, Markwell SJ *et al.* 2005 FAS expression inversely correlates with PTEN level in prostate cancer and a PI 3-kinase inhibitor synergizes with FAS siRNA to induce apoptosis. *Oncogene* **24** 5389–5395. (doi:10.1038/sj.onc.1208555)
- Barron C, Tsiani E & Tsakiridis T 2012 Expression of the glucose transporters GLUT1 , GLUT3 , GLUT4 and GLUT12 in human cancer cells. *BMC Proceedings* **6** P4. (doi:10.1186/1753-6561-6-S3-P4)
- Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch a, van der Mey a, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN *et al.* 2000 Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science (New York, NY)* **287** 848–851. (doi:10.1126/science.287.5454.848)

- Baysal BE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Drovdic CM, Savul SA, McLeod DR, Yee HA, Brackmann DE, Slattery WH, Myers EN *et al.* 2002 Prevalence of SDHB, SDHC, and SDHD germline mutations in clinic patients with head and neck paragangliomas. *Journal of Medical Genetics* **39** 178–183. (doi:10.1111/j.1399-0004.2004.00328.x)
- Beeckmans S 1984 Review Some Structural and Regulatory of Citrate Syntetase. *Int. J. Biochem.* **16** 341–351.
- Bénard J, Da Silva J, De Blois MC, Boyer P, Riou G, Duviard P & Chiric E 1985 Characterization of a Human Ovarian Adenocarcinoma Line, IGROV1, in Tissue Culture and in Nude Mice. *Cancer Research* **45** 4970–4979.
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MNC, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E & Vousden KH 2006 TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* **126** 107–120. (doi:10.1016/j.cell.2006.05.036)
- Berg J, Tymoczko J & Stryer L 2007 *Biochemistry*.
- Berridge M, Tan A, McCoy K & Wang R 1996 The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4–9.
- Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Bonnet S *et al.* 2007 A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell* **11** 37–51. (doi:10.1016/j.ccr.2006.10.020)
- Boxer GE & Dev TM 1961 Pathways of Intracellular Hydrogen Transport. *Science* **134** 1495–1501.
- Bozza PT & Viola JPB 2010 Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* **82** 243–250. (doi:10.1016/j.plefa.2010.02.005)
- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** 248–254. (doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brahimi-Horn MC, Chiche J & Pouyssegur J 2007 Hypoxia and cancer. *Journal of Molecular Medicine* **85** 1301–1307. (doi:10.1007/s00109-007-0281-3)
- Bricker DK, Taylor EB, Schell JC, Orsak T, Boutron A, Chen Y-C, Cox JE, Cardon CM, Van Vranken JG, Dephourse N *et al.* 2012 A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, Drosophila, and humans. *Science* **337** 96–100. (doi:10.1126/science.1218099)
- Bristow RG & Hill RP 2008 Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature Reviews. Cancer* **8** 180–192. (doi:10.1038/nrc2344)
- Bui T & Thompson CB 2006 Cancer's sweet tooth. *Cancer Cell* **9** 419–420. (doi:10.1016/j.ccr.2006.05.012)
- Buick RN, Pullano R & Trent JM 1985 Comparative Properties of Five Human Ovarian Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Research* **45** 3668–3676.
- Cairns RA, Papandreou I, Sutphin PD & Denko NC 2007 Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104** 9445–9450. (doi:10.1073/pnas.0611662104)
- Cairns RA, Harris IS & Mak TW 2011 Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* **11** 85–95. (doi:10.1038/nrc2981)
- Cairns RA, Iqbal J, Lemonnier F, Kucuk C, De Leval L, Jais JP, Parrens M, Martin A, Xerri L, Brousset P *et al.* 2012 IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* **119** 1901–1903. (doi:10.1182/blood-2011-11-391748)

- Cao W, Yacoub S, Shiverick KT, Namiki K, Sakai Y, Porvasnik S, Urbanek C & Rosser CJ 2008 Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate* **68** 1223–1231. (doi:10.1002/pros.20788)
- Cardaci S & Ciriolo MR 2012 TCA cycle defects and cancer: When metabolism tunes redox state. *International Journal of Cell Biology*. (doi:10.1155/2012/161837)
- Carew JS & Huang P 2002 Mitochondrial defects in cancer. *Molecular Cancer* **1** 9. (doi:10.1186/1476-4598-1-9)
- Caro P, Kishan AU, Norberg E, Stanley IA, Chapuy B, Ficarro SB, Polak K, Tondera D, Gounarides J, Yin H *et al.* 2012 Metabolic Signatures Uncover Distinct Targets in Molecular Subsets of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell* **22** 547–560. (doi:10.1016/j.ccr.2012.08.014)
- Carracedo A, Cantley LC & Pandolfi PP 2013 Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat.Rev.Cancer* **13** 227–232. (doi:10.1038/nrc3483.Cancer)
- Carvajal-Carmona LG, Alam NA, Pollard PJ, Jones AM, Barclay E, Wortham N, Pignatelli M, Freeman A, Pomplun S, Ellis I *et al.* 2006 Adult leydig cell tumors of the testis caused by germline fumarate hydratase mutations. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91** 3071–3075. (doi:10.1210/jc.2006-0183)
- Chajès V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM & Joulin V 2006 Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Research* **66** 5287–5294. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1489)
- Chang Q, Jurisica I, Do T & Hedley DW 2011 Hypoxia predicts aggressive growth and spontaneous metastasis formation from orthotopically grown primary xenografts of human pancreatic cancer. *Cancer Research* **71** 3110–3120. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4049)
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, Finetti P, Adélaïde J, Cervera N, Fekairi S, Xerri L, Jacquemier J, Birnbaum D *et al.* 2005 Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene* **25** 2273–2284. (doi:10.1038/sj.onc.1209254)
- Chiche J, Brahimi-Horn MC & Pouyssegur J 2010 Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: A common feature in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **14** 771–794. (doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x)
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL & Cantley LC 2008 The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* **452** 230–233. (doi:10.1038/nature06734)
- Cohen AL, Holmen SL & Colman H 2013 IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Current Neurology and Neuroscience Reports* **13** 345. (doi:10.1007/s11910-013-0345-4)
- Colombo N, Peiretti M, Parma G, Lapresa M, Mancari R, Carinelli S, Sessa C & Castiglione M 2010 Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* **21** 23–30. (doi:10.1093/annonc/mdq244)
- Coy JF, Dressler D, Wilde J & Schubert P 2005 Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: Clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clinical Laboratory* **51** 257–273.
- Crabtree HG 1928 The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths. *Biochemical Journal* **22** 1289–1298. (doi:10.1042/bj0221289)
- Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC & Farese R V. 2013 Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metabolism* **18** 153–161. (doi:10.1016/j.cmet.2013.05.017)

- Czernin J & Phelps ME 2002 Positron emission tomography scanning: current and future applications. *Annual Review of Medicine* **53** 89–112. (doi:10.1146/annurev.med.53.082901.104028)
- Dang C V, Kim J, Gao P & Yustein J 2008 The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nature Reviews Cancer* **8** 51–56. (doi:10.1038/nrc2274)
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S & Thompson CB 2007 Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** 19345–19350. (doi:10.1073/pnas.0709747104)
- Denko NC 2008 Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer* **8** 705–713. (doi:10.1038/nrc2468)
- Divakaruni AS, Rogers GW, Andreyev AY & Murphy AN 2016 The CPT inhibitor etomoxir has an off-target effect on the adenine nucleotide translocase and respiratory complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1857** e118. (doi:10.1016/j.bbabo.2016.04.250)
- Doherty JR & Cleveland JL 2013 Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation* **123** 3685–3692. (doi:10.1172/JCI69741)
- Domcke S, Sinha R, Levine D a, Sander C & Schultz N 2013 Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nature Communications* **4** 2126. (doi:10.1038/ncomms3126)
- Drapier J-C & Hibbs JB 1996 [3] Aconitases: A class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods in Enzymology* **269** 26–36. (doi:10.1016/S0076-6879(96)69006-5)
- Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z & Schumacker PT 1998 Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* **273** 11619–11624. (doi:10.1074/jbc.273.19.11619)
- Eboli ML 1985 Pyruvate dehydrogenase levels in Morris hepatomas with different growth rate. *Cancer Letters* **26** 185–190. (doi:10.1016/0304-3835(85)90025-4)
- Eboli ML & Galeotti T 1981 Evidence for the occurrence of the malate-citrate shuttle in intact Ehrlich ascites tumor cells. *BBA - Bioenergetics* **638** 75–79. (doi:10.1016/0005-2728(81)90187-0)
- Eigenbrodt E, Reinacher M, Scheefers-Borchel U, Scheefers H & Friis R 1992 Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Critical Reviews in Oncogenesis* **3** 91–115.
- Elwood JC 1968 Effect of Oxamate on Glycolysis and Respiration in Sarcoma 37 Ascites Cells. *Cancer Research* **28** 2056–2060.
- Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, Miller C, Demonacos C, Stratford IJ & Dive C 2004 Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Molecular and Cellular Biology* **24** 2875–2889. (doi:10.1128/MCB.24.7.2875-2889.2004)
- Fantin VR, St-Pierre J & Leder P 2006 Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* **9** 425–434. (doi:10.1016/j.ccr.2006.04.023)

- Fiume L, Manerba M, Vettraino M & Di Stefano G 2010 Impairment of aerobic glycolysis by inhibitors of lactic dehydrogenase hinders the growth of human hepatocellular carcinoma cell lines. *Pharmacology* **86** 157–162. (doi:10.1159/000317519)
- Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B & Jain RK 2001 Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Research* **61** 6020–6024.
- Gansler TS, Hardman W, Hunt DA, Schaffel S & Hennigar RA 1997 Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Human Pathology* **28** 686–692. (doi:10.1016/S0046-8177(97)90177-5)
- Gatenby RA & Gillies RJ 2004 Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer* **4** 891–899. (doi:10.1038/nrc1478)
- Giordano A, Calvani M, Petillo O, Grippo P, Tuccillo F, Melone M, Bonelli P, Calarco A & Peluso G 2005 tBid induces alterations of mitochondrial fatty acid oxidation flux by malonyl-CoA-independent inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1. *Cell Death and Differentiation* **12** 603–613. (doi:10.1038/sj.cdd.4401636)
- de Gonzalo-Calvo D, López-Vilaró L, Nasarre L, Perez-Olabarria M, Vázquez T, Escuin D, Badimon L, Barnadas A, Lerma E & Llorente-Cortés V 2015 Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer* **15** 460. (doi:10.1186/s12885-015-1469-5)
- Grassian AR, Metallo CM, Coloff JL, Stephanopoulos G & Brugge JS 2011 Erk regulation of pyruvate dehydrogenase flux through PDK4 modulates cell proliferation. *Genes and Development* **25** 1716–1733. (doi:10.1101/gad.16771811)
- Greenhouse WV V & Lehninger AL 1976 Occurrence of the Malate-Aspartate Shuttle in Various Tumor Types. *Cancer Research* **36** 1392–1396.
- Guertin DA & Sabatini DM 2007 Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* **12** 9–22. (doi:10.1016/j.ccr.2007.05.008)
- Guillaumond F, Bidaut G, Ouaisi M, Servais S, Gouirand V, Olivares O, Lac S, Borge L, Roques J, Gayet O *et al.* 2015 Cholesterol uptake disruption, in association with chemotherapy, is a promising combined metabolic therapy for pancreatic adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112** 2473–2478. (doi:10.1073/pnas.1421601112)
- Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U & Schumacker PT 2005 Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metabolism* **1** 401–408. (doi:10.1016/j.cmet.2005.05.001)
- Hakala MT, Glead AJ & Schwert GW 1955 Lactic Dehydrogenase - Variation of kinetic and equilibrium constants with temperature. *Journal of Biological Chemistry* **221** 191–209.
- Halestrap A P & Denton RM 1975 The specificity and metabolic implications of the inhibition of pyruvate transport in isolated mitochondria and intact tissue preparations by alpha-Cyano-4-hydroxycinnamate and related compounds. *The Biochemical Journal* **148** 97–106.
- Halestrap A & P 1975 The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *The Biochemical Journal* **148** 85–96.

- Halestrap AP & Price NT 1999 The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *The Biochemical Journal* **343 Pt 2** 281–299. (doi:10.1042/0264-6021:3430281)
- Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR & Ozols RF 1983 Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Research* **43** 5379–5389.
- Hamilton E, Fennell M & Stafford DM 1995 Modification of tumour glucose metabolism for therapeutic benefit. *Acta Oncol* **34** 429–433. (doi:10.3109/02841869509094003)
- Hanahan D & Weinberg RA 2011 Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144** 646–674. (doi:10.1016/j.cell.2011.02.013)
- Hansford RG & Cohen L 1978 Relative importance of pyruvate dehydrogenase interconversion and feed-back inhibition in the effect of fatty acids on pyruvate oxidation by rat heart mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **191** 65–81. (doi:10.1016/0003-9861(78)90068-1)
- Harris R, Huang B & Wu P 2001 Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression. *Advances in Enzyme Regulation* **41** 269–288.
- Harris RA, Bowker-Kinley MM, Huang B & Wu P 2002 Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. In *Advances in Enzyme Regulation*, pp 249–259. (doi:10.1016/S0065-2571(01)00061-9)
- Hatefi Y & Stiggall DL 1978 Preparation and properties of succinate: Ubiquinone oxidoreductase (complex II). In *Biomembranes - Part D: Biological Oxidations*, pp 21–27. Ed SF and LPBT-M in Enzymology. Academic Press. (doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(78)53008-5)
- Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, Hingorani SR, Tuveson DA & Thompson CB 2005 ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* **8** 311–321. (doi:10.1016/j.ccr.2005.09.008)
- Hausladen A & Fridovich I 1996 Measuring nitric oxide and superoxide: rate constants for aconitase reactivity. *Methods in Enzymology* **269** 37–41.
- Vander Heiden MG, Cantley LC & Thompson CB 2009 Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)* **324** 1029–1033. (doi:10.1126/science.1160809)
- Herzig S, Raemy E, Montessuit S, Veuthey J-L, Zamboni N, Westermann B, Kunji ERS, Martinou J-C, Hiltunen JK, Chen Z *et al.* 2012 Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science (New York, N.Y.)* **337** 93–96. (doi:10.1126/science.1218530)
- Hill RP, Marie-Egyptienne DT & Hedley DW 2009 Cancer Stem Cells, Hypoxia and Metastasis. *Seminars in Radiation Oncology* **19** 106–111. (doi:10.1016/j.semradonc.2008.12.002)
- Hirschhaeuser F, Sattler UGA & Mueller-Klieser W 2011 Lactate: A metabolic key player in cancer. *Cancer Research* **71** 6921–6925. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1457)
- Ho N & Coomber BL 2014 Pyruvate dehydrogenase kinase expression and metabolic changes following dichloroacetate exposure in anoxic human colorectal cancer cells. *Experimental Cell Research* 1–9. (doi:10.1016/j.yexcr.2014.12.006)
- Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C & Schumacker PT 1998 Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* **273** 18092–18098. (doi:10.1074/jbc.273.29.18092)

- Hoshino D, Tamura Y, Masuda H, Matsunaga Y & Hatta H 2015 Effects of decreased lactate accumulation after dichloroacetate administration on exercise training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle. *Physiological Reports* **3** e12555. (doi:10.14814/phy2.12555)
- Howlett R a, Heigenhauser GJ, Hultman E, Hollidge-Horvat MG & Spriet LL 1999 Effects of dichloroacetate infusion on human skeletal muscle metabolism at the onset of exercise. *The American Journal of Physiology* **277** E18–E25.
- Huang B, Wu P, Popov KM & Harris RA 2003 Starvation and diabetes reduce the amount of pyruvate dehydrogenase phosphatase in rat heart and kidney. *Diabetes* **52** 1371–1376. (doi:10.2337/diabetes.52.6.1371)
- Jang A & Hill RP 1997 An examination of the effects of hypoxia, acidosis, and glucose starvation on the expression of metastasis-associated genes in murine tumor cells. *Clinical and Experimental Metastasis* **15** 469–483. (doi:10.1023/A:1018470709523)
- Jang M, Kim SS & Lee J 2013 Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Experimental & Molecular Medicine* **45** e45. (doi:10.1038/emm.2013.85)
- Jeoung NH & Harris RA 2010 Role of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in regulation of blood glucose levels. *Korean Diabetes Journal* **34** 274–283. (doi:10.4093/kdj.2010.34.5.274)
- Jiang P, Du W, Mancuso A, Wellen KE & Yang X 2013 Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature* **493** 689–693. (doi:10.1038/nature11776)
- Jones JB, Song JJ, Hempen PM, Parmigiani G, Hruban RH & Kern SE 2001 Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer offers a ‘mass’-ive advantage over detection of nuclear DNA mutations. *Cancer Research* **61** 1299–1304.
- Kamarajugadda S, Stemboroski L, Cai Q, Simpson NE, Nayak S, Tan M & Lu J 2012 Glucose Oxidation Modulates Anoikis and Tumor Metastasis. *Molecular and Cellular Biology* **32** 1893–1907. (doi:10.1128/MCB.06248-11)
- Kankotia S & Stacpoole PW 2014 Dichloroacetate and cancer: New home for an orphan drug? *Biochimica et Biophysica Acta* **1846** 617–629. (doi:10.1016/j.bbcan.2014.08.005)
- Kauppinen RA, Sihra TS & Nicholls DG 1987 Aminooxyacetic acid inhibits the malate-aspartate shuttle in isolated nerve terminals and prevents the mitochondria from utilizing glycolytic substrates. *BBA - Molecular Cell Research* **930** 173–178. (doi:10.1016/0167-4889(87)90029-2)
- Khasawneh J, Schulz MD, Walch A, Rozman J, Hrabe de Angelis M, Klingenspor M, Buck A, Schwaiger M, Saur D, Schmid RM *et al.* 2009 Inflammation and mitochondrial fatty acid beta-oxidation link obesity to early tumor promotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** 3354–3359. (doi:10.1073/pnas.0802864106)
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL & Dang C V. 2006 HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism* **3** 177–185. (doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002)
- Kim J, Gao P, Liu Y-C, Semenza GL & Dang C V 2007 Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Molecular and Cellular Biology* **27** 7381–7393. (doi:10.1128/MCB.00440-07)

- Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR & Brown JM 2010 Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *Journal of Clinical Investigation* **120** 694–705. (doi:10.1172/JCI40283)
- Kirito K, Hu Y & Komatsu N 2009 HIF-1 prevents the overproduction of mitochondrial ROS after cytokine stimulation through induction of PDK-1. *Cell Cycle* **8** 2844–2849. (doi:10.4161/cc.8.17.9544)
- Knobloch M, Braun SMG, Zurkirchen L, von Schoultz C, Zamboni N, Araújo-Bravo MJ, Kovacs WJ, Karalay O, Suter U, Machado RAC *et al.* 2013 Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature* **493** 226–230. (doi:10.1038/nature11689)
- Kornacker MS & Ball EC 1965 Citrate Cleavage in Adipose Tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **54** 899–904.
- Kruszynska YT & Sherratt HS 1987 Glucose kinetics during acute and chronic treatment of rats with 2[6(4-chloro-phenoxy)hexyl]oxirane-2-carboxylate, etomoxir. *Biochemical Pharmacology* **36** 3917–3921. (doi:10.1016/0006-2952(87)90458-8)
- Kuhajda FP 2000 Fatty-acid synthase and human cancer: New perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* **16** 202–208.
- Van Kuppeveld FJM, Van der Logt JTM, Angulo AF, Van Zoest MJ, Quint WG V, Niesters HGM, Galama JMD & Melchers WJG 1992 Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **58** 2606–2615. (doi:1381174)
- Kurman RJ & Shih I-M 2010 The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *The American Journal of Surgical Pathology* **34** 433–443. (doi:10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79)
- Launonen V, Vierimaa O, Kiuru M, Isola J, Roth S, Pukkala E, Sistonen P, Herva R & Aaltonen LA 2001 Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** 3387–3392. (doi:10.1073/pnas.051633798)
- Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N & Sessa C 2013 Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* **24**. (doi:10.1093/annonc/mdt333)
- Lehtonen HJ, Kiuru M, Ylisaukko-Oja SK, Salovaara R, Herva R, Koivisto PA, Vierimaa O, Aittomäki K, Pukkala E, Launonen V *et al.* 2006 Increased risk of cancer in patients with fumarate hydratase germline mutation. *Journal of Medical Genetics* **43** 523–526. (doi:10.1136/jmg.2005.036400)
- Lengyel E 2010 Ovarian cancer development and metastasis. *The American Journal of Pathology* **177** 1053–1064. (doi:10.2353/ajpath.2010.100105)
- Letnansky K & Klc GM 1969 Glycerolphosphate Cycle Oxidoreductases in Ehrlich the Glycerophosphate Cells Tumor An enzymatic process known as the glycerophosphate cycle ' has been observed in the cellular metabolism of the flight muscles of insects (I-3). Subsequently this cycle h. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **130** 218–226.
- Li J & Cheng J-X 2014 Direct visualization of de novo lipogenesis in single living cells. *Scientific Reports* **4** 6807. (doi:10.1038/srep06807)

- Lin C-C, Cheng T-L, Tsai W-H, Tsai H-J, Hu K-H, Chang H-C, Yeh C-W, Chen Y-C, Liao C-C & Chang W-T 2012 Loss of the respiratory enzyme citrate synthase directly links the Warburg effect to tumor malignancy. *Scientific Reports* **2** 785. (doi:10.1038/srep00785)
- Lin G, Hill DK, Andrejeva G, Boulton JKR, Troy H, Fong a-CLFWT, Orton MR, Panek R, Parkes HG, Jafar M *et al.* 2014 Dichloroacetate induces autophagy in colorectal cancer cells and tumours. *British Journal of Cancer* **111** 375–385. (doi:10.1038/bjc.2014.281)
- Liu VW, Shi HH, Cheung a N, Chiu PM, Leung TW, Nagley P, Wong LC & Ngan HY 2001 High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Research* **61** 5998–6001.
- Liu Y, Zuckier LS & Ghesani N V. 2010 Dominant uptake of fatty acid over glucose by prostate cells: A potential new diagnostic and therapeutic approach. *Anticancer Research* **30** 369–374.
- Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, Heffron G, Metallo CM, Muranen T, Sharfi H *et al.* 2011 Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nature Genetics* **43** 869–874. (doi:10.1038/ng.890)
- Locasale JW, Grassian A, Beroukhi R, Meyerson M, Wagner G, Asara JM, Brugge JS, Vander Heiden MG & Cantley LC 2012 Amplification of phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *BMC Proceedings* **6**.
- Loda M, Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, Priolo C, Zadra G, Inazuka F, Grisanzio C, Palescandolo E *et al.* 2009 Fatty acid synthase: A metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **101** 519–532. (doi:10.1093/jnci/djp030)
- Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend C a, Ronnett G V, Lane MD & Kuhajda FP 2000 Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science (New York, N.Y.)* **288** 2379–2381. (doi:10.1126/science.288.5475.2379)
- Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T & Schönekeess BO 1994 Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1213** 263–276. (doi:10.1016/0005-2760(94)00082-4)
- Lopez-Alarcon L & Eboli ML 1986 Oxidation of Reduced Cytosolic Nicotinamide Adenine Dinucleotide by The Malate-Aspartate shuttle in the K-562 Human Leukemia Cell Line. *Cancer Research* **46** 5589–5591.
- López-Lázaro M 2008 The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **8** 305–312. (doi:10.2174/187152008783961932)
- Lu CW, Lin SC, Chen KF, Lai YY & Tsai SJ 2008 Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance. *Journal of Biological Chemistry* **283** 28106–28114. (doi:10.1074/jbc.M803508200)
- Lu QY, Zhang L, Yee JK, Go VL & Lee WN 2014 Metabolic consequences of LDHA inhibition by epigallocatechin gallate and oxamate in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. *Metabolomics* 71–80. (doi:10.1007/s11306-014-0672-8)
- Lunt SJ, Chaudary N & Hill RP 2008 The tumor microenvironment and metastatic disease. *Clinical & Experimental Metastasis* **26** 19–34. (doi:10.1007/s10585-008-9182-2)
- Macheda ML, Rogers S & Best JD 2005 Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *Journal of Cellular Physiology* **202** 654–662. (doi:10.1002/jcp.20166)

- Manning BD & Cantley LC 2007 AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **129** 1261–1274. (doi:10.1016/j.cell.2007.06.009)
- Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Encalada R, Moreno-Sánchez R & Saavedra E 2011 Modeling cancer glycolysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1807** 755–767. (doi:10.1016/j.bbabi.2010.11.006)
- Martinez-Zaguilan R, Seftor EA, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ & Hendrix MJ 1996 Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* **14** 176–186. (doi:10.1007/BF00121214)
- Mathupala SP, Rempel A & Pedersen PL 2001 Glucose catabolism in cancer cells: Identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *Journal of Biological Chemistry* **276** 43407–43412. (doi:10.1074/jbc.M108181200)
- Matoba S, Kang J-G, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F & Hwang PM 2006 P53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science* **312** 1650–1653. (doi:10.1126/science.1126863)
- Máximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J & Sobrinho-Simões M 2002 Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hürthle cell tumors. *The American Journal of Pathology* **160** 1857–1865. (doi:10.1016/S0002-9440(10)61132-7)
- Mazan-Mamczarz K, Hagner P, Dai B, Corl S, Liu Z & Gartenhaus RB 2009 Targeted suppression of MCT-1 attenuates the malignant phenotype through a translational mechanism. *Leukemia Research* **33** 474–482. (doi:10.1016/j.leukres.2008.08.012)
- Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Dürr P & Eigenbrodt E 2001 Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene* **20** 6891–6898. (doi:10.1038/sj.onc.1204792)
- McFate T, Mohyeldin A, Lu H, Thakar J, Henriques J, Halim ND, Wu H, Schell MJ, Tsang TM, Teahan O *et al.* 2008 Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* **283** 22700–22708. (doi:10.1074/jbc.M801765200)
- Menendez JA & Lupu R 2007 Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews. Cancer* **7** 763–777. (doi:10.1038/nrc2222)
- Mi RK, Min SK, Ji EO, Yoo RK, Sang YS, Seong IS, Ji YL, Nam JY & Sug HL 2009 Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *International Journal of Cancer* **125** 353–355. (doi:10.1002/ijc.24379)
- Michelakis ED, Webster L & Mackey JR 2008 Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *British Journal of Cancer* **99** 989–994. (doi:10.1038/sj.bjc.6604554)
- Migita T, Narita T, Nomura K, Miyagi E, Inazuka F, Matsuura M, Ushijima M, Mashima T, Seimiya H, Satoh Y *et al.* 2008 ATP citrate lyase: Activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *Cancer Research* **68** 8547–8554. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1235)
- Miskimins WK, Ahn HJ, Kim JY, Ryu S, Jung YS & Choi JY 2014 Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PLoS ONE* **9**. (doi:10.1371/journal.pone.0085576)
- Mizushima N & Komatsu M 2011 Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* **147** 728–741. (doi:10.1016/j.cell.2011.10.026)

- Modena P, Testi MA, Facchinetti F, Mezzanzanica D, Radice MT, Pilotti S & Sozzi G 2003 UQCRH gene encoding mitochondrial Hinge protein is interrupted by a translocation in a soft-tissue sarcoma and epigenetically inactivated in some cancer cell lines. *Oncogene* **22** 4586–4593. (doi:10.1038/sj.onc.1206472)
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A & Saavedra E 2007 Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS Journal* **274** 1393–1418. (doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x)
- Mosmann T 1983 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65** 55–63. (doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nagelkerke A, Sweep FCGJ, Geurts-Moespot A, Bussink J & Span PN 2015 Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part I: Molecular pathways controlling autophagy. *Seminars in Cancer Biology* **31** 89–98. (doi:10.1016/j.semcancer.2014.05.004)
- Neumann HP, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, Buchta M, Franke G, Klisch J, Bley TA *et al.* 2004 Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *Jama* **292** 943–951. (doi:10.1001/jama.292.8.943)
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F *et al.* 2006 A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* **10** 515–527. (doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008)
- Niemann S & Müller U 2000 Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nature Genetics* **26** 268–270. (doi:10.1038/81551)
- Owens KM, Kulawiec M, Desouki MM, Vanniarajan A & Singh KK 2011 Impaired OXPHOS complex III in breast cancer. *PLoS ONE* **6**. (doi:10.1371/journal.pone.0023846)
- Palmieri D, Fitzgerald D, Shreeve SM, Hua E, Bronder JL, Weil RJ, Davis S, Stark AM, Merino MJ, Kurek R *et al.* 2009 Analyses of resected human brain metastases of breast cancer reveal the association between up-regulation of hexokinase 2 and poor prognosis. *Molecular Cancer Research* **7** 1438–1445. (doi:10.1158/1541-7786.mcr-09-0234)
- Papaconstantinou J & Colowick SP 1961 The role of glycolysis in the growth of tumor cells. II. The effect of oxamic acid on the growth of HeLa cells in tissue culture. *Journal of Biological Chemistry* **236** 285–288.
- Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL & Denko NC 2006 HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism* **3** 187–197. (doi:10.1016/j.cmet.2006.01.012)
- Parolin MLML, Spriet LLLL, Hultman EE, Matsos MPMP, Hollidge-Horvat MGMG, Jones NLNL & Heigenhauser GJGJ 2000 Effects of PDH activation by dichloroacetate in human skeletal muscle during exercise in hypoxia. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **279** E752–E761.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I-M, Gallia GL *et al.* 2008 An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321** 1807–1812. (doi:10.1126/science.1164382)
- Paumen MB, Ishida Y, Han H, Muramatsu M, Eguchi Y, Tsujimoto Y & Honjo T 1997 Direct interaction of the mitochondrial membrane protein carnitine palmitoyltransferase I with Bcl-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **231** 523–525. (doi:10.1006/bbrc.1997.6089)

- Pawlu C, Bausch B & Neumann HPH 2005 Mutations of the SDHB and SDHD genes. *Familial Cancer* **4** 49–54. (doi:10.1007/s10689-004-4227-4)
- Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S & Comoglio PM 2003 Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* **3** 347–361. (doi:10.1016/S1535-6108(03)00085-0)
- Pértega-Gomes N, Vizcaíno JR, Miranda-Gonçalves V, Pinheiro C, Silva J, Pereira H, Monteiro P, Henrique RM, Reis RM, Lopes C *et al.* 2011 Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer* **11** 312. (doi:10.1186/1471-2407-11-312)
- Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH *et al.* 2005 mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** 719–724. (doi:10.1073/pnas.0408894102)
- Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S, Angulo-Brown F, Santillan M, Calleja-Quevedo E, Waddell TG, Repovic P, Melendez-Hevia E, Heinrich R *et al.* 2001 Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science (New York, N.Y.)* **292** 504–507. (doi:10.1126/science.1058079)
- Pike LS, Smift AL, Croteau NJ, Ferrick DA & Wu M 2011 Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1807** 726–731. (doi:10.1016/j.bbabo.2010.10.022)
- Pinheiro C, Longatto-Filho A, Scapulatempo C, Ferreira L, Martins S, Pellerin L, Rodrigues M, Alves VAF, Schmitt F & Baltazar F 2008a Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Archiv* **452** 139–146. (doi:10.1007/s00428-007-0558-5)
- Pinheiro C, Longatto-Filho A, Ferreira L, Pereira SMM, Etlinger D, Moreira M a R, Jubé LF, Queiroz GS, Schmitt F & Baltazar F 2008b Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists* **27** 568–574. (doi:10.1097/PGP.0b013e31817b5b40)
- Pinheiro C, Sousa B, Albergaria A, Paredes J, Dufloth R, Vieira D, Schmitt F & Baltazar F 2011 GLUT1 and CAIX expression profiles in breast cancer correlate with adverse prognostic factors and MCT1 overexpression. *Histology and Histopathology* **26** 1279–1286. (doi:10.1016/S1359-6349(10)71197-6)
- Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL, Townsend CA & Kuhajda FP 2000 Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Research* **60** 213–218.
- Pollari S, Käkönen SM, Edgren H, Wolf M, Kohonen P, Sara H, Guise T, Nees M & Kallioniemi O 2011 Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclastogenesis. *Breast Cancer Research and Treatment* **125** 421–430. (doi:10.1007/s10549-010-0848-5)
- Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush M a, Kinzler KW & Vogelstein B 1998 Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nature Genetics* **20** 291–293. (doi:10.1038/3108)

- Qiu B, Ackerman D, Sanchez DJ, Li B, Ochocki JD, Grazioli A, Bobrovnikova-Marjon E, Alan Diehl J, Keith B & Celeste Simon M 2016 HIF2alpha-dependent lipid storage promotes endoplasmic reticulum homeostasis in clear-cell renal cell carcinoma. *Cancer Discovery* **5** 653–667. (doi:10.1158/2159-8290.CD-14-1507)
- Qu Y, Han B, Yu Y, Yao W, Bose S, Karlan BY, Giuliano AE & Cui X 2015 Evaluation of MCF10A as a reliable model for normal human mammary epithelial cells. *PLoS ONE* **10**. (doi:10.1371/journal.pone.0131285)
- Rabinowitz JD & White E 2010 Autophagy and metabolism. *Science (New York, N.Y.)* **330** 1344–1348. (doi:10.1126/science.1193497)
- Randle PJ 1986 Fuel selection in animals. *Biochemical Society Transactions* **14** 799–806.
- Reinartz S, Finkernagel F, Adhikary T, Rohnalter V, Schumann T, Schober Y, Nockher WA, Nist A, Stiewe T, Jansen JM *et al.* 2016 A transcriptome-based global map of signaling pathways in the ovarian cancer microenvironment associated with clinical outcome. *Genome Biology* **17** 108. (doi:10.1186/s13059-016-0956-6)
- Rempel A, Mathupala SP & Pedersen PL 1996 Glucose catabolism in cancer cells: Regulation of the type II hexokinase promoter by glucose and cyclic AMP. *FEBS Letters* **385** 233–237. (doi:10.1016/0014-5793(96)00399-7)
- Robey IF, Baggett BK, Kirkpatrick ND, Roe DJ, Dosescu J, Sloane BF, Hashini AI, Morse DL, Raghunand N, Gatenby RA *et al.* 2009 Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Research* **69** 2260–2268. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5575)
- Roche TE & Hiromasa Y 2007 Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64** 830–849. (doi:10.1007/s00018-007-6380-z)
- Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K & Galappathi K 2006 Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Research* **66** 6699–6707. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0983)
- Rohnalter V, Roth K, Finkernagel F, Adhikary T, Obert J, Dorzweiler K, Bensberg M, Muller-Brusselbach S & Muller R 2015 A multi-stage process including transient polyploidization and EMT precedes the emergence of chemoresistent ovarian carcinoma cells with a dedifferentiated and pro-inflammatory secretory phenotype. *Oncotarget* **6** 40005–40025. (doi:10.18632/oncotarget.5552)
- Rose IA & O'Connell EL 1967 Mechanism of aconitase action. I. The hydrogen transfer reaction. *Journal of Biological Chemistry* **242** 1870–1879.
- Rottem S & Naot Y 1998 Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends in Microbiology* **6** 436–440. (doi:10.1016/S0966-842X(98)01358-4)
- Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, Keulers T, Mujcic H, Landuyt W, Voncken JW *et al.* 2010 The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* **120** 127–141. (doi:10.1172/jci40027)
- Saddik M, Gamble J, Witters LA & Lopaschuk GD 1993 Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart. *The Journal of Biological Chemistry* **268** 25836–25845.
- Sambrook J & W Russell D 2001 Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY* 999.

- Samudio I & Harmancey R 2010 Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *The Journal of Clinical Investigation*. (doi:10.1172/JCI38942.promote)
- Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, Kaluarachchi K, Bornmann W, Duvvuri S, Taegtmeyer H *et al.* 2010 Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *Journal of Clinical Investigation* **120** 142–156. (doi:10.1172/JCI38942)
- Santos CR & Schulze A 2012 Lipid metabolism in cancer. *FEBS Journal* **279** 2610–2623. (doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x)
- Sattler UG a, Hirschhaeuser F & Mueller-Klieser WF 2010 Manipulation of glycolysis in malignant tumors: fantasy or therapy? *Current Medicinal Chemistry* **17** 96–108. (doi:10.2174/092986710790112657)
- Schell JC, Olson KA, Jiang L, Hawkins AJ, VanVranken JG, Xie J, Egnatchik RA, Earl EG, DeBerardinis RJ & Rutter J 2014 A role for the mitochondrial pyruvate carrier as a repressor of the warburg effect and colon cancer cell growth. *Molecular Cell* **56** 400–413. (doi:10.1016/j.molcel.2014.09.026)
- Schlappack OK, Zimmermann A & Hill RP 1991 Glucose starvation and acidosis: effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumour cells. *British Journal of Cancer* **64** 663–670. (doi:10.1038/bjc.1991.378)
- Schwickert G, Walenta S, Sundf r K, Rofstad EK & Mueller-Klieser W 1995 Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Research* **55** 4757–4759.
- Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB & Gottlieb E 2005 Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-?? prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* **7** 77–85. (doi:10.1016/j.ccr.2004.11.022)
- Selby PL & Sherratt HSA 1989 Substituted 2-oxiranecarboxylic acids: a new group of candidate hypoglycaemic drugs. *Trends in Pharmacological Sciences* **10** 495–500. (doi:10.1016/0165-6147(89)90049-7)
- Semenza GL 2000 *Hypoxia, Clonal Selection, and the Role of HIF-1 in Tumor Progression*. (doi:10.1080/10409230091169186)
- Semenza GL 2010 HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics and Development* **20** 51–56. (doi:10.1016/j.gde.2009.10.009)
- Shackelford DB & Shaw RJ 2009 The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature Reviews Cancer* **9** 563–575. (doi:10.1038/nrc2676)
- Shangraw RE & Jahoor F 2004 Mechanism of dichloroacetate-induced hypolactatemia in humans with or without cirrhosis. *Metabolism: Clinical and Experimental* **53** 1087–1094. (doi:10.1016/j.metabol.2004.02.020)
- Shaw TJ, Senterman MK, Dawson K, Crane CA & Vanderhyden BC 2004 Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Molecular Therapy* **10** 1032–1042. (doi:10.1016/j.ymthe.2004.08.013)
- Shi Q, Le X, Wang B, Abbruzzese JL, Xiong Q, He Y & Xie K 2001 Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene* **20** 3751–3756. (doi:10.1038/sj.onc.1204500)
- Singh KK 2004 Mitochondrial dysfunction is a common phenotype in aging and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1019** 260–264. (doi:10.1196/annals.1297.043)

- Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD, Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF & Brooks SC 1990 Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Research* **50** 6075–6086.
- Srere P a., Brazil H, Gonen L & Takahashi M 1963 The Citrate Condensing Enzyme of Pigeon Breast Muscle and Moth Flight Muscle. *Acta Chemica Scandinavica* **17 suppl.** 129–134. (doi:10.3891/acta.chem.scand.17s-0129)
- Stacpoole PW 1989 The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism* **38** 1124–1144. (doi:10.1016/0026-0495(89)90051-6)
- Stacpoole PW, Henderson GN, Yan Z & James MO 1998 Clinical pharmacology and toxicology of dichloroacetate. *Environmental Health Perspectives* **106 Suppl** 989–994. (doi:10.1289/ehp.98106s4989)
- Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, Benchimol S & Mak TW 2001 Regulation of PTEN transcription by p53. *Molecular Cell* **8** 317–325. (doi:10.1016/S1097-2765(01)00323-9)
- Stanley WC, Hernandez L a, Spires D, Bringas J, Wallace S & McCormack JG 1996 Pyruvate dehydrogenase activity and malonyl CoA levels in normal and ischemic swine myocardium: effects of dichloroacetate. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **28** 905–914. (doi:10.1006/jmcc.1996.0085)
- Sugden MC & Holness MJ 2003 Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **284** E855–E862. (doi:10.1152/ajpendo.00526.2002)
- Sun Q, Chen X, Ma J, Peng H, Wang F, Zha X, Wang Y, Jing Y, Yang H, Chen R *et al.* 2011 Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** 4129–4134. (doi:10.1073/pnas.1014769108)
- Taylor RW & Turnbull DM 2005 Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews. Genetics* **6** 389–402. (doi:10.1038/nrg1606)
- Tennant D a, Durán R V & Gottlieb E 2010 Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer* **10** 267–277. (doi:10.1038/nrc2817)
- Thompson CB 2009 Metabolic enzymes as oncogenes or tumor suppressors. *The New England Journal of Medicine* **360** 813–815. (doi:10.1056/NEJMe0810213)
- Thornburg JM, Nelson KK, Clem BF, Lane AN, Arumugam S, Simmons A, Eaton JW, Telang S & Chesney J 2008 Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR* **10** R84. (doi:10.1186/bcr2154)
- Tirado-Vélez JM, Joumady I, Sáez-Benito A, Cózar-Castellano I & Perdomo G 2012 Inhibition of Fatty Acid Metabolism Reduces Human Myeloma Cells Proliferation. *PLoS ONE* **7**. (doi:10.1371/journal.pone.0046484)
- Tomlinson IPM, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EEM, Kelsell D, Leigh I, Gorman P, Lamlum H, Rahman S *et al.* 2002 Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nature Genetics* **30** 406–410. (doi:10.1038/ng849)
- Vickers AE 2009 Characterization of hepatic mitochondrial injury induced by fatty acid oxidation inhibitors. *Toxicol Pathol* **37** 78–88. (doi:10.1177/0192623308329285)

- Walenta S, Salameh a, Lyng H, Evensen JF, Mitze M, Rofstad EK & Mueller-Klieser W 1997 Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *The American Journal of Pathology* **150** 409–415.
- Wang P, Mai C, Wei Y, Zhao J, Hu Y, Zeng Z, Yang J, Lu W, Xu R & Huang P 2013 Decreased expression of the mitochondrial metabolic enzyme aconitase (ACO2) is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Medical Oncology* **30** 552. (doi:10.1007/s12032-013-0552-5)
- Warburg O 1956 Origin of cancer cells. *Oncologia* **9** 75–83. (doi:10.1136/bmj.1.4082.694-a)
- Warburg O, Posener K & Negelein E 1924 Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochemische Zeitschrift* **152** 309–344. (doi:10.1007/BF01058673)
- Weinhouse S 1976 The Warburg hypothesis fifty years later. *Zeitschrift Für Krebsforschung Und Klinische Onkologie. Cancer Research and Clinical Oncology* **87** 115–126. (doi:10.1007/BF00284370)
- White E 2012 Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer* **12** 401–410. (doi:10.1038/nrc3262 [doi])
- Wong JYY, Huggins GS, Debidia M, Munshi NC & De Vivo I 2008 Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecologic Oncology* **109** 394–402. (doi:10.1016/j.ygyno.2008.01.038)
- Wong K-K, Engelman JA & Cantley LC 2010 Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* **20** 87–90. (doi:10.1016/j.gde.2009.11.002)
- Xiao C, Lachance B, Sunahara G & Luong JHT 2002 An in-depth analysis of electric cell-substrate impedance sensing to study the attachment and spreading of mammalian cells. *Analytical Chemistry* **74** 1333–1339.
- Xu L & Fidler IJ 2000 Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Research* **60** 4610–4616. (doi:10.1016/s0065-230x(08)60946-x)
- Yen KE, Bittinger M a, Su SM & Fantin VR 2010 Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene* **29** 6409–6417. (doi:10.1038/onc.2010.444)
- Younes M, Lechago L V., Somoano JR, Mosharaf M & Lechago J 1996 Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Research* **56** 1164–1167.
- Yue S, Li J, Lee SY, Lee HJ, Shao T, Song B, Cheng L, Masterson TA, Liu X, Ratliff TL *et al.* 2014 Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell Metabolism* **19** 393–406. (doi:10.1016/j.cmet.2014.01.019)
- Yusenko M V., Ruppert T & Kovacs G 2010 Analysis of differentially expressed mitochondrial proteins in chromophobe renal cell carcinomas and renal oncocytomas by 2-D gel electrophoresis. *International Journal of Biological Sciences* **6** 213–224. (doi:10.7150/ijbs.6.213)
- Zaugg K, Yao Y, Reilly PT, Kannan K, Kiarash R, Mason J, Huang P, Sawyer SK, Fuerth B, Faubert B *et al.* 2011 Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev* **25** 1041–1051. (doi:10.1101/gad.1987211)
- Zeczycki TN, Maurice MS & Attwood P V 2010 Inhibitors of Pyruvate Carboxylase. *The Open Enzyme Inhibition Journal* **3** 8–26. (doi:10.2174/1874940201003010008)

- Zhao Z, Han F, Yang S, Wu J & Zhan W 2015 Oxamate-mediated inhibition of lactate dehydrogenase induces protective autophagy in gastric cancer cells: Involvement of the Akt-mTOR signaling pathway. *Cancer Letters* **358** 17–26. (doi:10.1016/j.canlet.2014.11.046)
- Zhou M, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Liu Z, Fodstad O, Riker AI, Kamarajugadda S, Lu J, Owen LB *et al.* 2010 Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Molecular Cancer* **9** 33. (doi:10.1186/1476-4598-9-33)
- Zois CE, Favaro E & Harris AL 2014 Glycogen metabolism in cancer. *Biochemical Pharmacology* **92** 3–11. (doi:10.1016/j.bcp.2014.09.001)

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Gießen:

Clauß, Dammann, Dorresteyn, Ehlers, Ekschmitt, Evguenieva-Hackenberg, Forchhammer, Forreiter, Fox, Friedhoff, Fronius, Gläser, Göttlich, Gottschalk, Grünhage, Hafke, Holz, Hughes, Kauschke, Klar, Klug, Lakes-Harlan, Martin, Marxsen, Meiss, Pingoud, Renkawitz, Richter, Schindler, Schmidt, Selzer, Stenzel, Trenczek, Treuner-Lange, VanBel, Wende, Wilhelm, Wissemann, Wolters, Zeidler

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rolf Müller für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, die konstruktiven Anregungen und Diskussionen sowie für das kritische Korrekturlesen des Manuskripts.

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an PD Wolfgang "Wolfi" Meißner, der mich jederzeit mit wertvollen Ratschlägen unterstützt hat. Du hast mir mit wundervollen Leitsätzen wie "dicke Menschen haben weniger Augen als dünne (Normalisiert auf das Gewicht)", "heißes Glas sieht aus wie kaltes Glas" oder "wenn der Vogel frisst dann pfeift er nicht" das Leben immer ein wenig erheitert und einfacher gemacht. Zusätzlich konnten wir beide nicht nur den FAC postulieren, sondern auch wertvolle Erkenntnisse zum allgemeinen Verständnis des Lebens experimentell gewinnen: Darunter sind vor allem "tote Zellen atmen nicht" und "keine Zellen atmen auch nicht" zu nennen. Danke, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest und mir über das ein oder andere moralische, aber auch metabolische Tief hinweggeholfen hast.

Der gesamten aktuellen Arbeitsgruppe und natürlich auch den ehemaligen Arbeitskollegen danke ich für die schöne Zusammenarbeit, die gute und oftmals auch lustige Arbeitsatmosphäre. Ich freue mich besonders, dass ich einige von euch mittlerweile zu meinen wirklich guten Freunden zählen kann. Vor allem dir, Eve, danke ich neben der fachlichen Zusammenarbeit für die zahllosen lustigen Momente. Nicht umsonst wurden wir als das Labor -Yin und -Yang bezeichnet.

Außerdem möchte ich den Kooperationspartnern danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Der Core-Facility "Massenspektrometrie", darunter vor allem Dr. Jelena Pesek und Dr. Yvonne Schober danke ich für die schnelle Probenaufarbeitung und hilfreichen Tipps zur Auswertung des Datenwustes. Dr. Oliver Stehling danke ich für das Material und die Hilfe bei der Durchführung der Enzymaktivitätsassays.

Den fleißigen Korrekturlesern danke ich für die Zeit, die sie sich genommen haben, um mir mit vielen Kommas, Anmerkungen und konstruktiver Kritik weiter zu helfen.

Der gesamten Gießen-Crew, meinen Mädels von zu Hause und natürlich Tina und Steffi danke ich für die tolle Zeit, die vielen Durchhalteparolen, das ein oder andere Trost-Bier, konstruktive Diskussionen und die Partys, die helfen den Kopf mal wieder frei zu bekommen und mit neuer Motivation den nächsten Tag zu beginnen.

Meiner Familie danke ich für die moralische Unterstützung in den letzten Jahren.

Lennart, auch wenn es dein Lebensinhalt ist, mich zu ärgern und aufzuziehen, bist du doch in den richtigen Momenten da! Du hast es in den vergangenen Jahren immer wieder geschafft aus Frust Mut und aus Verzweiflung einen Plan zu machen. Du hast mich immer aufgebaut, auch wenn das oft bestimmt nicht leicht war. Ich danke dir für die letzten Jahre und freue mich auf die vielen, die noch kommen werden!

